



**HAL**  
open science

**Epizootiologie et contribution à la caractérisation de  
l'agent infectieux de la maladie du muscle marron, une  
pathologie émergente de la palourde japonaise,  
Venerupis philippinarum**

Cindy Binias

► **To cite this version:**

Cindy Binias. Epizootiologie et contribution à la caractérisation de l'agent infectieux de la maladie du muscle marron, une pathologie émergente de la palourde japonaise, *Venerupis philippinarum*. Autre [q-bio.OT]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR14935 . tel-00949926

**HAL Id: tel-00949926**

**<https://theses.hal.science/tel-00949926>**

Submitted on 20 Feb 2014

**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.

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

## L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

Ecole doctorale Sciences et Environnements

Par M<sup>elle</sup> Cindy BINIAS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : Biogéochimie et Ecosystèmes

---

Caractérisation de l'agent infectieux et épizootiologie de la  
maladie du muscle marron (BMD), une pathologie émergente  
de la palourde japonaise,  
*Venerupis (= Ruditapes) philippinarum*

---

Soutenance prévue le : 6 décembre 2013

Après avis de :

M Michel BREMONT-DELETANG, Directeur de recherche INRA, Jouy-en-Josas	Rapporteur
M Philippe SOUDANT, Directeur de recherche CNRS, Université de Bretagne occidentale	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M <sup>me</sup> Isabelle ARZUL, Cadre de recherche IFREMER, La Tremblade	Examinatrice
M Michel BREMONT-DELETANG, Directeur de recherche INRA, Jouy-en-Josas	Rapporteur
M Frédéric GARABETIAN, Professeur, Université Bordeaux 1	Examineur
M Patrice GONZALEZ, Chargé de recherche CNRS, Université Bordeaux 1	Directeur de thèse
M Xavier de MONTAUDOUIN, Maître de conférences, Université Bordeaux 1	Directeur de thèse
M Philippe SOUDANT, Directeur de recherche CNRS, Université de Bretagne occidentale	Rapporteur



---

## Sommaire

---

<b>Introduction générale</b> .....	1
1. Contexte de l'étude .....	2
1.1 La part des bivalves dans la production mondiale des pêches et de l'aquaculture .....	2
1.2 Impact des maladies sur le suivi des stocks .....	3
2. La maladie du muscle marron (BMD).....	6
2.1 La palourde japonaise <i>Venerupis philippinarum</i> .....	7
2.2 Le bassin d'Arcachon .....	10
2.3 Etat actuel des connaissances sur la BMD et l'agent étiologique .....	14
2.3.1 Sur les palourdes japonaises du bassin d'Arcachon .....	14
2.3.1.1 Description de la maladie .....	14
2.3.1.2 Agent étiologique .....	16
2.3.1.3 Impacts sur l'hôte .....	17
2.3.1.4 Quelques chiffres.....	18
2.3.2 ...et ailleurs .....	18
3. Problématique et organisation du manuscrit .....	20

---

### PARTIE 1. La BMD : epizootiologie et impact sur l'hôte

---

<b>Chapitre I. Facteurs environnementaux contribuant au développement de la BMD et de la perkinsose chez la palourde japonaise (<i>Venerupis philippinarum</i>) dans le bassin d'Arcachon</b> .....	25
1. Introduction.....	26
2. Materials and Methods .....	28
2.1 Study site .....	28
2.2 Sampling procedure.....	28
2.3 Environmental factors .....	28
2.3.1 Grain size and organic matter .....	28
2.3.2 Biomass of seagrass foliage .....	28
2.3.3 Temperature, salinity, emersion time .....	30
2.4 Bivalve models and associated pathology.....	32
2.4.1 Manila clam and <i>Perkinsus</i> .....	32
2.4.2 Manila clam and BMD .....	32
3. Results .....	33
3.1 Environmental factors .....	33

3.2 Manila clam and Perkinsosis .....	35
3.3 Manila clam and Brown Muscle Disease .....	37
4. Discussion .....	38
<b>Chapitre II. Suivi Spatio-temporel de la BMD sur les palourdes du bassin d'Arcachon .....</b>	<b>41</b>
1. Introduction.....	42
2. Matériels et méthodes.....	43
2.1 Site d'étude.....	43
2.2 Campagnes annuelles d'échantillonnage .....	43
2.3 Prévalence et intensité de la BMD .....	44
2.4 Suivi mensuel.....	44
2.5 Analyses statistiques .....	45
3. Résultats.....	46
3.1 Comparaison à l'échelle du bassin .....	46
3.2 Comparaison à l'échelle des strates .....	46
3.3 Comparaison de différentes gammes de tailles.....	48
3.4 Comparaison des deux sous-bassins .....	50
3.5 Analyse des palourdes <i>V. decussata</i> et <i>P. aureus</i> .....	51
3.6 Suivi de cohorte.....	52
4. Discussion .....	53
4.1 Evolution de la BMD et des effectifs de palourde.....	53
4.2 Dynamique du système BMD/palourde .....	54
4.3 Spécificité de la BMD .....	55
<b>Chapitre III. BMD : impact sur la biologie de la palourde japonaise <i>Venerupis (=Ruditapes)</i></b> <b><i>philippinarum</i> .....</b>	<b>57</b>
Abstract .....	58
1. Introduction.....	59
2. Materials and methods .....	62
2.1. Sampling site.....	62
2.2. Sampling procedure.....	63
2.3. Immunological analyses .....	63
2.4. <i>Perkinsus</i> sp. abundance and Manila clam condition index.....	64
2.5. Gene analyses.....	64
2.6. Statistical analyses.....	66
3. Results .....	67

3.1. Physiological and cellular parameters .....	67
3.1.1 Shell-length.....	67
3.1.2 Condition index (CI) .....	67
3.1.3 <i>Perkinsus</i> sp. abundance and prevalence.....	69
3.1.4 Hemocyte parameters.....	69
3.2. Molecular parameter: gene expression .....	69
3.2.1 Posterior muscle.....	70
3.2.2 Gill.....	71
4. Discussion.....	72
4.1. Condition index.....	72
4.2. Impact on immune system .....	72
4.3. Energetic metabolism.....	73
5. Conclusion .....	75

---

## PARTIE 2 . Agent étiologique de la BMD

---

<b>Chapitre IV. Identification de l'agent étiologique / Microscopie électronique à transmission / Purification sur gradient de sucrose / Essais de clonage.....</b>	<b>79</b>
1. Microscopie optique et microscopie électronique sur manteau et pied .....	81
1.1 Matériels et méthodes .....	81
1.2 Résultats – conclusions.....	81
2. Purification des particules virales sur gradient de sucrose.....	86
2.1 Matériels et méthodes .....	86
2.1.1 Matériel biologique .....	86
2.1.2 Broyage des tissus .....	86
2.1.3 Purification 1 .....	86
2.1.4 Purification 2 .....	87
2.1.5 Purification 3 .....	87
2.1.6 Microscopie Electronique à Transmission.....	88
2.2 Résultats-conclusion.....	88
2.2.1 Utilisation d'un coussin de sucrose 30% .....	88
2.2.2 Purification en grande quantité.....	91
2.3 Conclusion .....	92
3. Identification de la nature du génome et essai de clonage.....	93
3.1 ADN ou ARN.....	93

3.1.1 Matériels et méthodes .....	94
3.1.2 Résultats-conclusion.....	94
3.2 Clonage .....	95
3.2.1 Matériels et méthodes .....	95
3.2.2 Résultats-conclusion.....	96
4. Conclusion générale et perspectives de travail .....	97

**Chapitre V. Infestation expérimentale de palourdes japonaises à partir de "particules virales" purifiées.....** 99

1. Introduction.....	100
2. Matériels et méthodes .....	102
2.1 Matériel biologique .....	102
2.2 Schéma expérimental .....	102
2.3 Données immunologiques.....	103
2.4 Analyse génétique .....	104
2.5 Analyse statistique.....	104
3. Résultats .....	106
3.1 Données immunologiques.....	106
3.2 Analyse génétique .....	107
3.2.1 Muscle postérieur.....	107
3.2.2 Glande digestive .....	108
4. Discussion .....	109

**Chapitre VI. Essais de primocultures d'hémocytes et de cellules musculaires de palourde japonaise.....** 111

1. Introduction.....	112
2. Matériels et méthodes .....	114
2.1 Mise en culture des cellules .....	114
2.2 Suivi de la survie-prolifération.....	115
2.3 Test 1 : Revêtement des plaques de culture cellulaire .....	116
2.4 Test 2 : Influence de la quantité de substrat et de la concentration initiale en cellules .....	116
2.5 Test 3 : Temps d'incubation avec le WST-1.....	117
2.6 Test 4 : durée de survie des lignées et milieu de culture .....	117
2.7 Analyse statistique.....	117
3. Résultats - Discussion .....	118
3.1 Test 1 : Revêtement des plaques de culture cellulaire. ....	118

3.2 Test 2 : Influence de la quantité de substrat et de la concentration initiale en cellule.....	120
3.3 Test 3 : Temps d'incubation avec le WST-1.....	122
3.4 Test 4 : durée de survie des lignées et milieu de culture.....	123
4. Conclusion – Perspectives.....	125

**Chapitre VII. Impact de la BMD sur la palourde japonaise et recherche de l'agent causal: approche de transcriptomique comparative.....** 129

1. Introduction.....	130
2. Matériels et méthodes.....	132
2.1 Matériel biologique.....	132
2.2 Extraction ARN.....	132
2.3 Préparation librairie d'ARN.....	132
2.4 Séquençage.....	133
2.4.1 Principe de la méthode Illumina.....	133
2.4.2 Dépôt des librairies sur la flowcell.....	135
2.5 Assemblage et analyse des données.....	135
3. Résultats - Discussion.....	137
3.1 Qualité des ARNs et des librairies.....	137
3.2 Résultats du séquençage.....	137
3.3 Expression différentielle des gènes chez les individus malades.....	138
3.3.1 Gènes sous-exprimés chez les individus malades.....	138
3.3.2 Gènes surexprimés chez les individus malades.....	140
3.4 Gènes spécifiques aux individus malades.....	143
4. Conclusion.....	145

**Conclusion générale et perspectives de recherche.....** 147

1. Epizootiologie de la BMD.....	148
2. Impact de la BMD sur la palourde japonaise.....	150
3. Virus or not virus ?.....	151
4. Perspectives de recherche.....	153

**Références bibliographiques.....** 155





---

# Introduction générale

---

## 1. Contexte de l'étude

### 1.1 La part des bivalves dans la production mondiale des pêches et de l'aquaculture

En 2010, la production mondiale d'animaux aquatiques s'élevait à 148 millions de tonnes (mt) pour un chiffre d'affaire de 217,5 milliards de dollars. La FAO estime entre 660 et 820 millions le nombre de personnes (soit 10 à 12 % de la population mondiale) dont la subsistance dépend de l'activité primaire, secondaire ou auxiliaire liée à ce secteur de production (FAO 2012).

La production mondiale aquatique telle que définie par la FAO regroupe les productions liées aux pêches de captures mais également à l'aquaculture. Elles étaient respectivement de 88,6 mt et 59,9 mt en 2010. Alors que les pêches de capture sont restées relativement stables depuis le début des années 90, l'aquaculture est en plein essor (Figure 1).

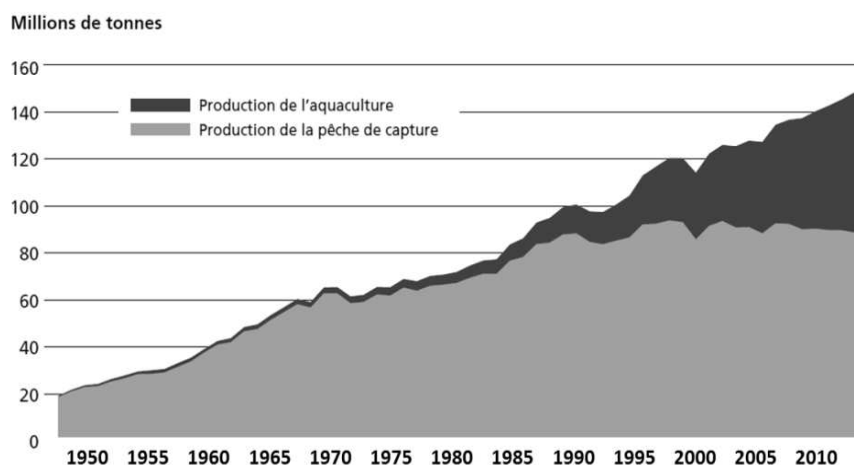


Figure 1. Evolution des productions de l'aquaculture et des pêches de capture pour l'ensemble des espèces aquacoles en millions de tonnes. (D'après FAO 2012)

En effet, sous la combinaison de la pression démographique grandissante et de pêches de capture ayant atteint leur potentiel maximal pour de nombreuses espèces, l'aquaculture représente une alternative intéressante à la consommation humaine. Alors qu'elle ne représentait que 4% de l'offre de produit halieutique en 1970, l'aquaculture fournit aujourd'hui près d'un tiers de la production mondiale. Cette augmentation repose majoritairement sur l'explosion de l'aquaculture chinoise qui a fourni 63% de la production mondiale en 2011.

La production aquacole mondiale est dominée par l'élevage des poissons d'eau douce (56,4 %). Les mollusques occupent la seconde place avec 23,6 % suivis des crustacés (9,6 %), des poissons diadromes (6 %), des poissons marins (3,1 %) et des autres animaux aquatiques (1,4 %).

La production mondiale de mollusques repose principalement sur l'aquaculture des bivalves et les pêches de céphalopodes (Figure 2). Bien que le groupe des palourdes, coques et arches soit majoritaire depuis quelques années, l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* reste le bivalve le plus produit avec près de 4 mt suivi de la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* avec 3,3 mt (FAO 2011).

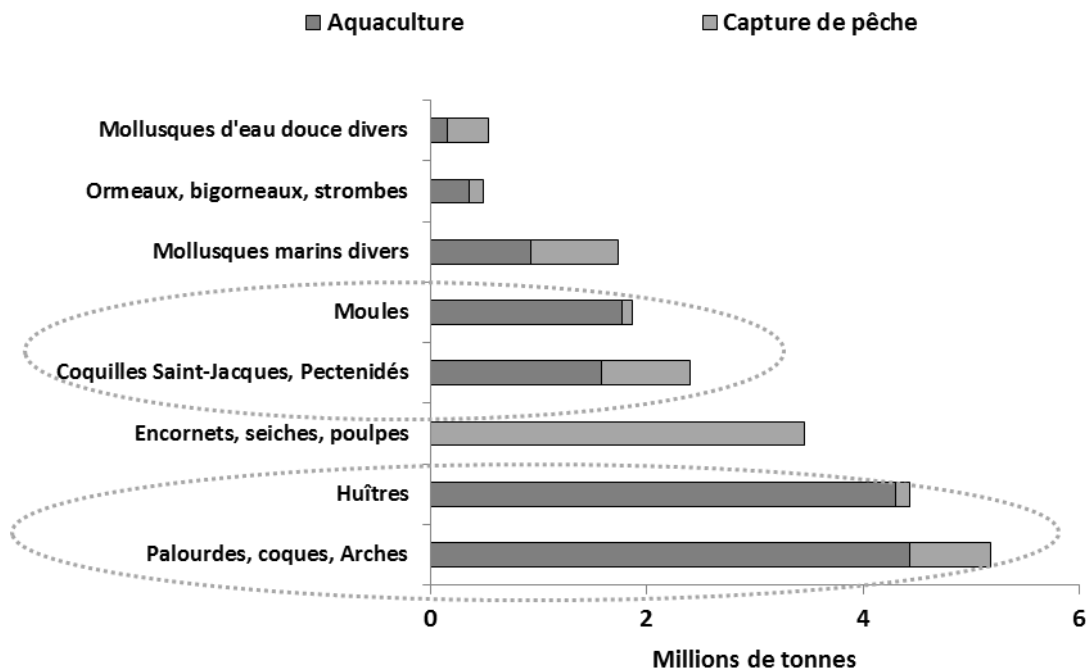


Figure 2. Part des bivalves ( ) dans la production mondiale (aquaculture + capture de pêche) de mollusques en millions de tonnes. Année 2009 (Source FAO 2012)

### 1.2 Impact des maladies sur le suivi des stocks

Au cours du siècle passé, la production mondiale des bivalves, et principalement celle liée à l'aquaculture, a été jalonnée de nombreux épisodes de mortalités qui sont à l'origine du paysage conchylicole actuel. Bien que tous ces épisodes de mortalités ne soient pas l'expression d'une maladie (facteurs environnementaux, catastrophes naturelles...), la majorité relève de pathologies diverses qui sont à l'origine de la disparition de certaines espèces et de l'apparition d'autres.

Un des premiers cas d'épizootie avérée a été décrit chez l'huître *Saccostrea glomerata* en Australie en 1924 (Roughley 1926). Cette épizootie nommée "Winter mortality" a provoqué des mortalités pouvant atteindre jusqu'à 70 % de la population et des pertes économiques de plusieurs millions de dollars.

En France, l'histoire de l'ostréiculture compte aussi plusieurs épizooties qui ont conduit à l'heure actuelle à une quasi-monoculture de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* (Figure 3).

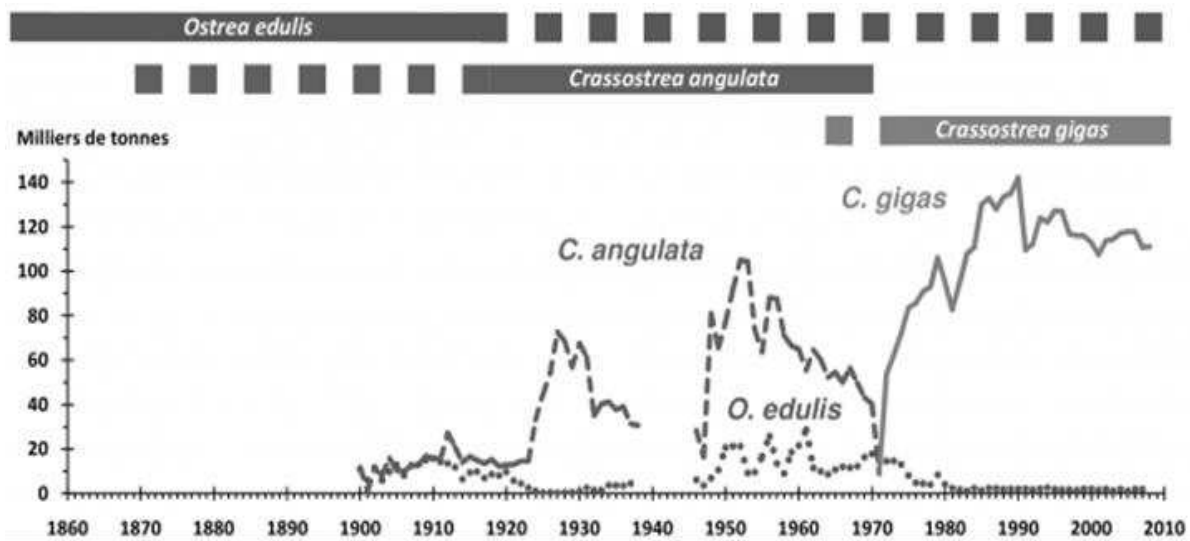


Figure 3. Historique de la production ostréicole française (D'après Gouletquer et al. 1998)

Jusque dans les années 1970, la production française reposait sur l'exploitation de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* introduite accidentellement en 1868. L'espèce endémique, l'huître plate *Ostrea edulis*, était toujours produite mais ne représentait qu'une faible proportion de la production totale. Entre 1969 et 1973, l'émergence probable d'un iridovirus, responsable de la "maladie des branchies" a conduit à la disparition complète de *C. angulata* le long des côtes françaises (Comps et al. 1976). En parallèle, la production d'huîtres plates, qui pouvait tout de même atteindre jusqu'à 20 000 t dans les années 50, a chuté de plus de 90% dans le milieu des années 70 suite à deux épizooties provoquées par les protozoaires *Marteilia refringens* et *Bonamia ostrea* (Grizel 1974).

L'ostréiculture française a été relancée dans les années 70 avec l'importation massive d'huître japonaise *Crassostrea gigas*. Cette production, la première d'Europe, est elle aussi soumise à des mortalités estivales importantes. Ces mortalités, de plus en plus alarmantes, depuis une quinzaine d'années seraient le résultat d'une étiologie multifactorielle entre : conditions environnementales, caractéristiques génétiques de l'hôte et association d'un ou plusieurs agents pathogènes bactériens du genre *Vibrio* et/ou viraux de type *Herpes* (Samain & McCombie 2008).

L'huître étant la première espèce bivalve exploitée, les "maladies ostréicoles" apparaissent parmi les plus courantes et les plus étudiées. Toutefois, de nombreuses pathologies ont été décrites sur la majorité des espèces de bivalves exploitées ou non (Lauckner 1983).

S'agissant de la seconde espèce de bivalve exploitée dans le monde (mais aussi dans le bassin d'Arcachon), deux pathologies principales ont été décrites sur la palourde japonaise *V. philippinarum* : la perkinsose et la Maladie de l'Anneau Brun (MAB, ou Brown Ring Disease - BRD).

La perkinsose, provoquée par le protozoaire *Perkinsus* spp. connaît une aire de répartition relativement étendue et une gamme d'hôtes extrêmement large, regroupant de nombreuses espèces de bivalves dont les huîtres, les ormeaux, les coquilles Saint-Jacques et les palourdes. Cette maladie est responsable de mortalités massives mais entraîne également des effets subléthaux sur la reproduction et la croissance qui ne sont pas sans impacts écologiques et économiques (Villalba et al. 2004, Soudant et al. 2013).

La BRD a été décrite suite à d'importantes mortalités observées sur divers sites français. Cette maladie a également été décrite en Norvège, Grande-Bretagne, Italie, Espagne et jusqu'en Corée du Sud (Paillard 2004). L'agent pathogène de la maladie est la bactérie *Vibrio tapetis*. Cette maladie entraîne un dysfonctionnement de la balance énergétique de l'hôte qui se traduit notamment par une diminution de la croissance et de la reproduction (Flye Saint-Marie et al. 2007). La bactérie est présente principalement entre le manteau et la coquille. La présence de la bactérie entraîne un dépôt de conchioline, formant ainsi un anneau brun symptomatique de la maladie. En cas de lésions tissulaires, *Vibrio* va pouvoir pénétrer dans le système circulatoire et les tissus et engendrer la mort par septicémie généralisée (Paillard 2004).

Au début des années 2000, des mortalités importantes de palourdes japonaises adultes ont été observées sur le site français d'Arcachon (Dang et al. 2008). Des investigations plus poussées ont conduit à la découverte en 2005 d'une nouvelle maladie : la maladie du muscle marron ou Brown Muscle Disease (BMD).

Cette pathologie émergente est le sujet de la présente thèse.

## 2. La maladie du muscle marron (BMD)

Une maladie se définit comme une altération de la santé et des fonctions des êtres vivants.

Chez les organismes aquacoles, les agents responsables de ces maladies peuvent être de différentes sortes : physiques, chimiques ou bien, comme dans le cas des maladies infectieuses étudiées ici, biologiques.

Cette classification peut sembler toutefois simpliste face à la complexité et à la multiplicité des facteurs intervenant dans l'apparition et la dispersion d'une maladie. L'approche intégrée de Snieszko (1974) représente une maladie au cœur d'un complexe de trois compartiments : l'hôte, le pathogène et l'environnement (Figure 4.A).

L'expression d'une maladie reposant sur les interactions entre différents facteurs appartenant à ces trois compartiments, seule l'étude du système dans son ensemble permet une bonne compréhension de la maladie.

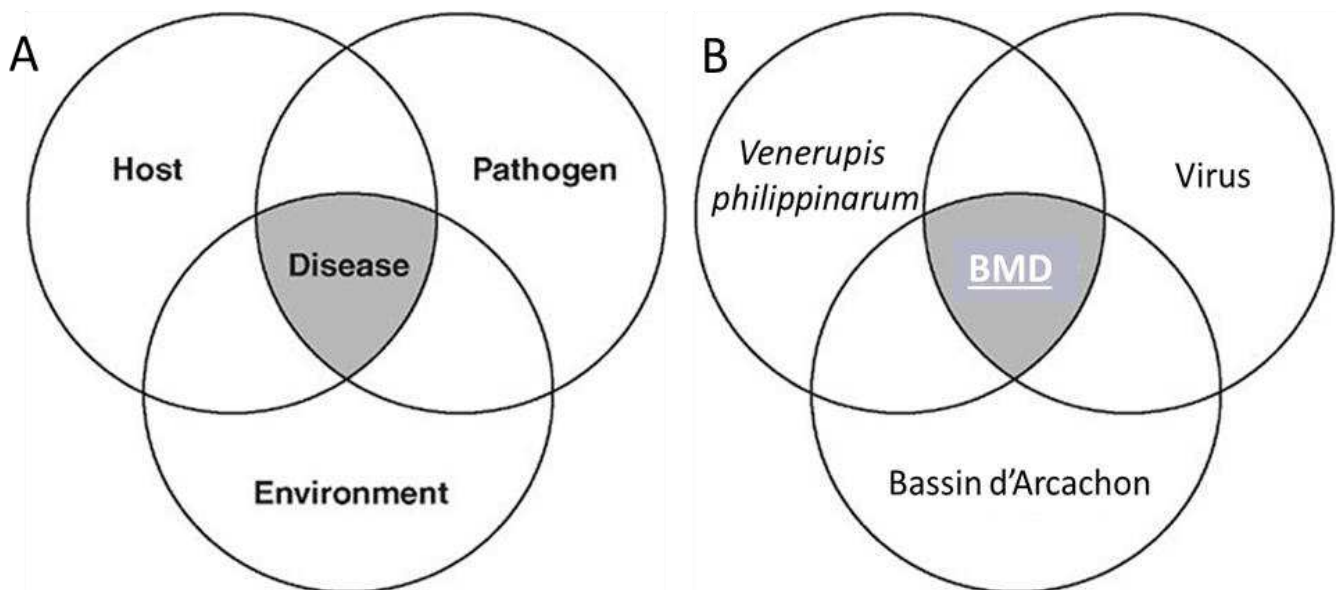


Figure 4. A-"The epidemiological triad" d'après Snieszko 1974 B-Application du graphique du Snieszko au cas de la maladie du muscle marron (BMD)

La suite de ce paragraphe repose sur le graphique modifié de Snieszko (Figure 4.B). Les sections 2.1 à 2.3 sont un état actuel (mais non exhaustif) des connaissances des 3 compartiments à étudier et de la BMD.

## 2.1 La palourde japonaise *Venerupis philippinarum*

La palourde japonaise, *Venerupis* (= *Ruditapes* = *Tapes*) *philippinarum* est une espèce originaire de la province indopacifique : Chine, Japon et mer des Philippines (Ponurovsky & Yakovlev 1992). Par sa grande plasticité d'adaptation aux conditions environnementales (*i.e.* elle supporte des conditions très variables de température et de salinité) elle s'est développée dans de nombreux pays suite à une introduction volontaire pour la conchyliculture ou accidentelle liée à l'importation de naissain d'huître (Le Treut 1986). La palourde japonaise vit entre les latitudes 25°N et 45°N (Figure 5).



Figure 5. Répartition mondiale de *Venerupis philippinarum*. Les zones grises représentent les pays où l'espèce est présente (D'après FAO 2013). NB : l'espèce a également été signalée récemment au Portugal

La palourde affectionne des milieux abrités et plus particulièrement ceux à salinité variable comme les baies ou les lagunes littorales. Elle affectionne de nombreux types de substrats meubles : vases, sables et graviers, ainsi que ceux à granulométrie mixte. La palourde possède de fortes facultés d'enfouissement dans ces différents sédiments, grâce à son pied très développé. La profondeur d'enfouissement est en moyenne de 7 cm. Elle peut atteindre 10-12 cm lors de très faibles températures hivernales (Le Treut 1986). Bien que la palourde japonaise soit une espèce très résistante aux variations environnementales de température et salinité, les préférences se situent autour de 18-25°C pour la température et 12-32 pour la salinité.

La palourde est une espèce gonochorique (les sexes sont séparés). Comme pour la plupart des bivalves, la gonade est diffuse dans la masse viscérale, à la base du pied. La maturité sexuelle apparaît à partir d'une longueur de coquille d'une vingtaine de millimètres. Le cycle reproducteur est connu pour être variable et plusieurs pontes sont possibles dans la même saison (Ponurovsky & Yakovlev 1992). Le processus de gamétogénèse est variable suivant la région géographique. Il est initié à partir de 12°C et est optimal lorsque la température atteint 20-22°C. La gamétogénèse dure



deux à cinq mois. Les gamètes sont émis dans la colonne d'eau où se déroule la fécondation. La qualité de l'alimentation aura une influence sur la quantité de gamètes émis.

La phase pélagique larvaire dure deux à quatre semaines (Le Treut 1986) avec une série de métamorphoses. Cette phase larvaire permet une dissémination importante au grès des courants mais est également vulnérable au vu des nombreux prédateurs présents (Le Treut 1986). Une fois accroché à son substrat, le reste du cycle de vie de la palourde sera benthique avec peu de chance de remise en suspension (de Montaudouin 1997) et de faibles capacités de déplacements horizontaux (maximum 6 mètres par mois en condition expérimentales, Tamura 1970). Une seconde période de reproduction peut survenir au cours de la même saison, de deux à trois mois plus tard.

La palourde est une espèce suspensivore. Elle se nourrit principalement de phytoplancton et de matière organique particulaire (Dang et al. 2009c). Les périodes de croissance et le niveau d'alimentation sont principalement régis par la température (Le Treut 1986).

Pour maintenir leur intégrité et se défendre contre les agents pathogènes, les mollusques bivalves possèdent un système immunitaire inné.

L'immunité innée, contrairement à l'immunité acquise rencontrée chez les vertébrés, se définit comme une réaction non spécifique, non adaptative et ne générant pas de mémoire immunitaire.

La reconnaissance des micro-organismes est réalisée par un nombre limité de récepteurs appelés Pattern-Recognition Receptors (PRRs). Ces récepteurs sont capables de reconnaître des composants microbiens, appelés « Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) qui peuvent être de différente nature : les lipopolysaccharides des bactéries à Gram-négatif, les peptidoglycanes des bactéries Gram-positif, les mannanes (sucres) des levures ou encore l'ARN des virus. Une grande partie des PRRs fait partie de la famille des Toll-Like Receptors (TLRs).

L'immunité est supportée par deux actions complémentaires : d'une part la défense cellulaire dont les médiateurs sont les hémocytes et d'autre part, la défense humorale impliquant des molécules libres.

Les hémocytes sont des cellules capables de proliférer et de se différencier pour induire une réponse immunitaire efficace, *e.g.* la phagocytose des éléments étrangers ou la libération de molécules actives destinées à détruire le corps étranger (Chu 2000). La phagocytose est considérée comme la première ligne de défense cellulaire chez les mollusques (Feng 1988). Son principe est fondamentalement le même entre les invertébrés et les vertébrés et repose sur 4 étapes : la reconnaissance, l'adhésion, l'ingestion et la destruction (Figure 6)

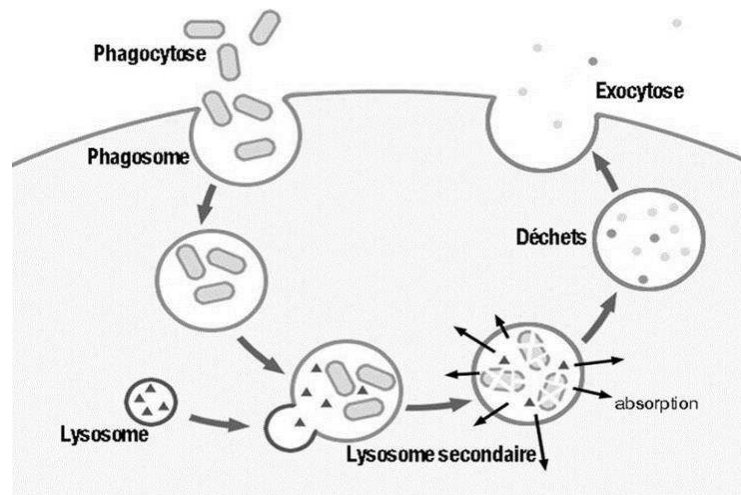


Figure 6. Etapes de la phagocytose

La reconnaissance des particules étrangères, qu'elles appartiennent aux cellules du soi, ou du non soi comme les pathogènes, va être réalisée de façon passive par la rencontre aléatoire entre les deux éléments ou activement par chimiotactisme. La cellule phagocytaire va ensuite adhérer à la particule étrangère. Cette adhésion est facilitée par l'opsonisation des corps étrangers, *i.e.* la sécrétion d'opsonines par les cellules du système immunitaire qui vont se fixer sur le corps étranger et ainsi permettre l'adhésion du phagocyte.

Le phagocyte va ensuite se transformer pour créer des pseudopodes, extensions cytoplasmiques qui vont englober le corps étranger et l'enfermer à l'intérieur du phagocyte dans une vacuole : le phagosome.

Les éléments présents dans le phagosome seront alors détruits soit par fusion du phagosome avec des lysosomes (le phagolysosome) où les enzymes lysosomiales s'attaqueront aux différents constituants de la particule ou du micro-organisme soit par action de diverses espèces réactives de l'oxygène lors du mécanisme appelé "Flambée oxydative".

Les débris de l'élément étranger seront ensuite évacués hors de la cellule par exocytose.

Lorsque l'organisme invasif est de taille supérieure aux hémocytes, ces derniers vont venir encapsuler l'élément étranger pour qu'il soit ensuite détruit par l'action des enzymes lysosomiales.

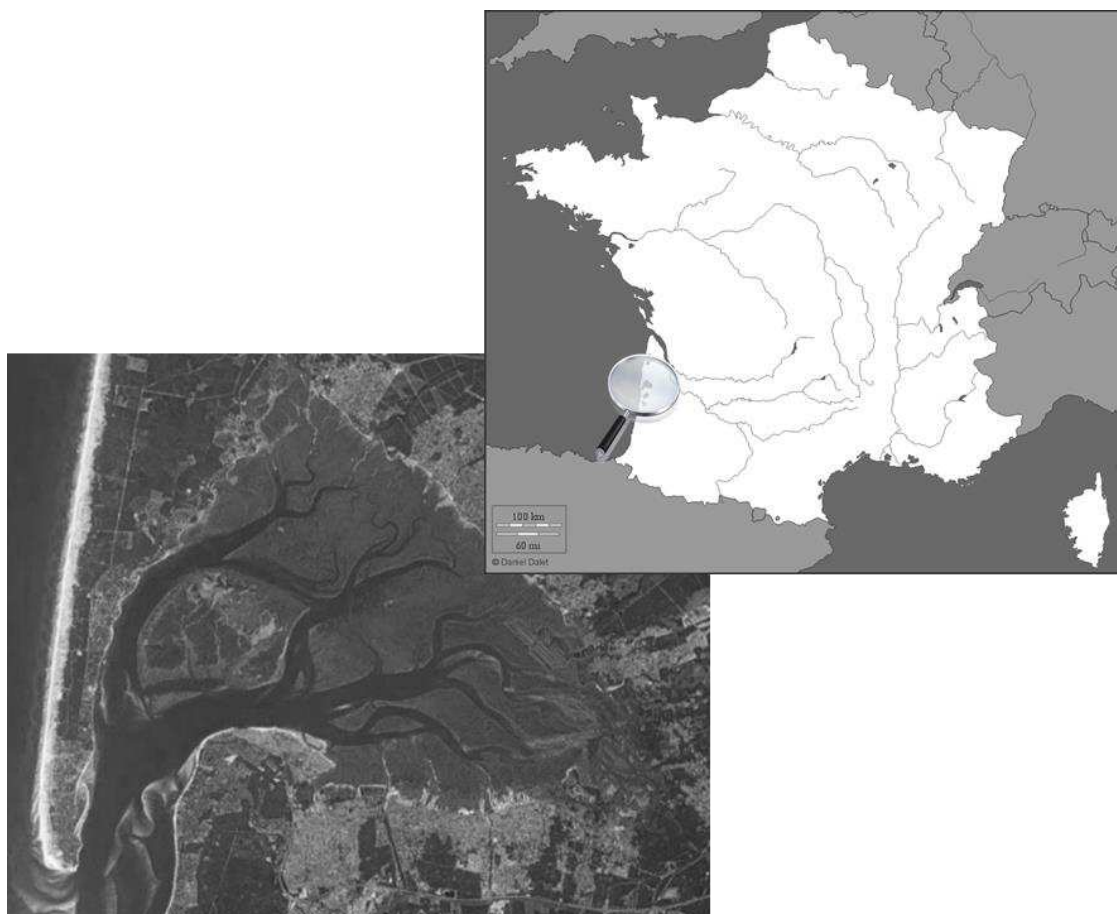
La défense humorale repose sur de nombreuses molécules

- les lectines : glycoprotéines qui réagissent spécifiquement avec les polysaccharides. Elles sont particulièrement impliquées dans la défense contre les bactéries

- les cytokines : molécules de communication qui agissent sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Ces molécules régulatrices comprennent les interleukines, les interférons, les Tumor Necrosis Factor (TNF) et les chemokines.
- les peptides anti-microbiens : peptides riches en cystéine comme par exemple les défensines
- les lysozymes : petites enzymes capables d'hydrolyser les liaisons des peptidoglycanes (composants majeurs de la paroi des bactéries à Gram-positif)

La voie alterne du complément est également impliquée dans l'immunité innée. Cet ensemble de protéine entraîne une cascade de réactions qui vont permettre la reconnaissance du micro-organisme et permettre la chimio-attraction des hémocytes permettant à long terme la phagocytose. La voie du complément va également stimuler la production des cytokines pour l'élimination de l'organisme étranger.

## ***2.2 Le bassin d'Arcachon***



*Figure 7. Carte du bassin d'Arcachon et localisation sur la côte atlantique française*

Le bassin d'Arcachon (44°40'N, 1°10'W) est une lagune semi-fermée située sur le rivage du Golfe de Gascogne (Figure 7). Sa superficie totale s'élève à 180 km<sup>2</sup> dont 115 km<sup>2</sup> sont émergés lors de la basse mer. Le régime de la lagune est méso- à macrotidal (Gassiat 1989) puisque le marnage est compris entre 0,90 m et 4,90 m. La marée est de type demi-diurne. Le bassin est relié à l'océan Atlantique au sud-est par un système de passes par lesquelles transitent entre 130 et 400.10<sup>6</sup> m<sup>3</sup> d'eau à chaque marée. Le volume de la lagune seule (*i.e.* sans les passes) est compris en moyenne entre 270.10<sup>6</sup> m<sup>3</sup> à basse mer et 460.10<sup>6</sup> m<sup>3</sup> à pleine mer (Auby 1991).

Chaque jour, les apports en eau douce du bassin s'élèvent à 3,45.10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>. Ils proviennent majoritairement des cours d'eau (83 %), et dans une moindre mesure des précipitations (11%) et du ruissellement de la nappe phréatique (6%).

Presque la moitié de la zone intertidale, 46 km<sup>2</sup> sur 115 km<sup>2</sup>, est recouverte par un herbier à *Zostera noltei* (Plus et al. 2010). Le bas des estrans est en partie consacré à l'activité ostréicole.

L'histoire de la palourde japonaise dans le bassin d'Arcachon commence au début des années 80. Elle avait déjà été introduite dans d'autres régions françaises dès 1972 par la Société ATLantique de MARiculture (SATMAR) à des fins conchylicoles (Flassch & Leborgne 1992). Entre 1980 et 1986, des ostréiculteurs arcachonnais se sont lancés dans l'élevage de la palourde japonaise *Venerupis philippinarum*, la vénériculture sur estran (Robert & Deltreil 1990). Cette tentative fut de courte durée. La forte chute des prix due à la concurrence économique de l'Espagne, du Portugal, de l'Italie et de la Tunisie ajoutée à l'action des prédateurs tels que le baliste (Popovsky et al. 1999) et à l'apparition de « gisements naturels » ont conduit à l'abandon de la vénériculture à la fin des années 80.

Cependant, les conditions environnementales favorables du bassin d'Arcachon associées au recrutement naturel ont permis à l'espèce de s'établir sur toute la zone intertidale. Dès le début des années 90, la palourde japonaise a supplanté l'espèce locale : la palourde européenne *Venerupis decussata* (Auby 1993). Les dernières estimations du stock de palourdes du bassin d'Arcachon font état d'une biomasse et d'un effectif total composés respectivement à 99% et 98% de palourde japonaise (Sanchez et al. 2013). La palourde européenne et la palourde jaune (*Polititapes aureus*) représentent les quelques % restant.

Bien que l'élevage de l'espèce japonaise ait été abandonné, la population néo-naturalisée a permis une importante activité de pêche, et la production annuelle du bassin d'Arcachon se stabilise aujourd'hui à 500-600 t (Sanchez et al. 2013). A l'échelle française, le bassin d'Arcachon

représente une part importante de la production de palourdes. En effet, la production du pays avoisine les 3 000 t dont 40% proviennent de la pêche et 60% de l'élevage (Comité national de la conchyliculture 2009. cnc-France.com).

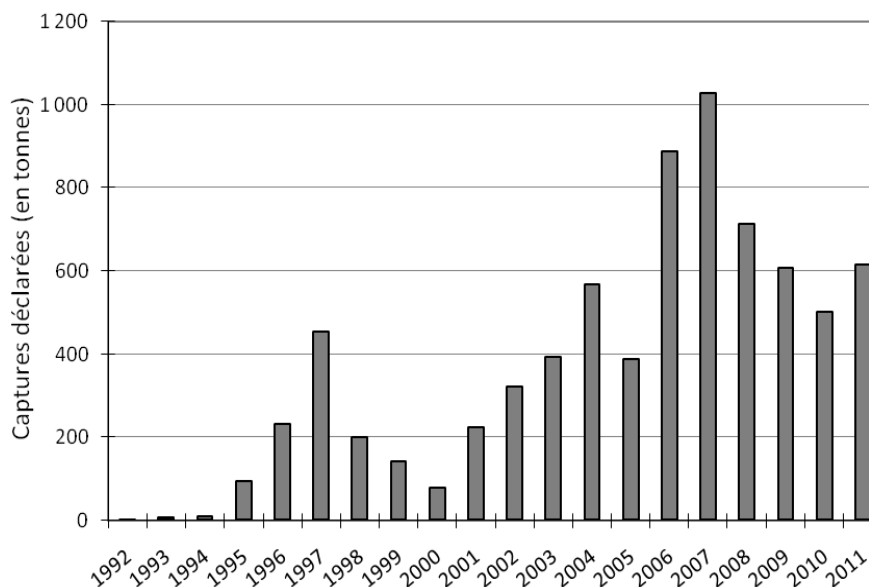


Figure 8. Captures de palourdes déclarées sur le bassin d'Arcachon (sources : CRTS La Rochelle, SIH Ifremer et Base Pêche Aquitaine (BPA) du CRPMEM Aquitaine) (D'après Sanchez et al. 2013)

L'apparition des statistiques de captures à partir de 1992 montre une très forte fluctuation de la production annuelle du bassin avec des années affichant des productions inférieures à 400 t et un pic de 1 028 t en 2007 (Figure 8).

Afin de maintenir un stock pérenne et de bonnes conditions d'exploitation, le Comité Local des Pêches Maritimes et des Elevages Marins d'Arcachon (CLPMEM) a mis en place, dès 1996, des mesures de gestion adaptées. Ces premières mesures consistaient en l'instauration de licences pour les pêcheurs et la fermeture à la pêche de certains sites pour créer des zones dites « de réserve ». Des campagnes d'évaluation du stock de palourdes ont par la suite été réalisées en 2000, 2003, 2006, 2008, 2010 et 2012 (Les 2 dernières campagnes ont permis un suivi de la BMD pour la présente thèse. Cf chapitre II). Ces campagnes permettent le suivi d'indicateurs standardisés, tels que la biomasse totale de palourdes japonaise et la fraction exploitable, *i.e.* les individus supérieurs à la taille légale de pêche professionnelle de 35 mm. Entre 2003 et 2008, la biomasse totale a connu une très forte baisse. Elle est passée de 7 992 t à 4 457 t (Figure 9).

*NB : le suivi de l'année 2000 n'est pas considéré puisqu'il ne prenait pas en compte toute l'aire de répartition de la palourde japonaise.*

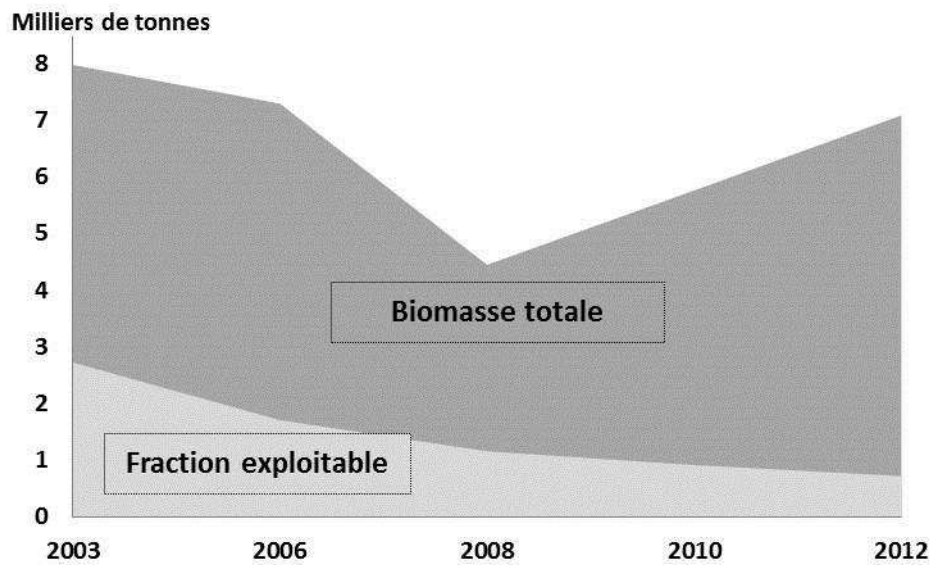


Figure 9. Evolution de la biomasse totale et de la fraction exploitable du stock arcachonnais de palourdes japonaises (Source IFREMER)

En 2008, la tendance s'est renversée et en 2012 la biomasse totale atteignait 7 099 t. Cependant, la fraction exploitable a continué de diminuer. Cette diminution se traduit par une proportion de plus en plus faible des individus de grande taille. Dans le même temps, de faibles niveaux de recrutement ont été observés.

En parallèle des évaluations de stock, des travaux de recherche ont été entrepris pour comprendre la dynamique de population de cette espèce. Ces études ont pointé du doigt, entre autres paramètres, l'importance d'une nouvelle pathologie: la maladie du muscle marron ou Brown Muscle Disease (BMD - Dang 2009), l'objet de cette thèse.

### **2.3 Etat actuel des connaissances sur la BMD et l'agent étiologique**

Le chapitre 2.3.1 est une synthèse bibliographique des travaux de Dang et al. qui ont découvert la BMD. Il repose sur 3 publications principales :

- "*Brown muscle disease (BMD), an emergent pathology affecting Manila clam Ruditapes philippinarum in Arcachon Bay (SW) France*" en 2008 (Diseases of Aquatic Organisms)
- "*Brown Muscle Disease and Manila Clam Ruditapes philippinarum Dynamics in Arcachon Bay, France*" en 2009 (Journal of Shellfish Research)
- "*Virus-like particles associated with brown muscle disease in Manila clam, Ruditapes philippinarum, in Arcachon Bay (France)*" en 2009b (Journal of Fish Diseases)

#### **2.3.1 Sur les palourdes japonaises du bassin d'Arcachon...**

##### *2.3.1.1 Description de la maladie*

Découverte en 2005 (mais sans doute installée avant), la BMD se caractérise par un muscle adducteur postérieur (le plus proche de la surface du sédiment lorsque la palourde est en position de vie normale, c'est-à-dire enfouie dans le sédiment) atrophié et des tissus dégradés. Le muscle devient progressivement brun et calcifié. Le muscle strié, le plus externe (Figure 10.A), est le premier touché par la maladie.

Le stade le moins avancé se traduit par l'apparence de petits nodules jaunes et de minuscules points bruns sur le pourtour du muscle strié. Ces symptômes se propagent jusqu'à atteindre le muscle lisse et recouvrir l'ensemble du muscle. Au stade terminal, les deux types de tissus musculaires (lisse et strié) sont totalement bruns et calcifiés.

Un indice a été proposé pour quantifier l'intensité de la maladie. Le MPI : "Muscle Print Index" permet de déterminer sur une échelle de 0 à 4 le pourcentage du muscle atteint par la maladie comme suit :

- 0 → stade sain, le muscle ne présente aucune altération (Figure 10.A)
- 1 → 0-25 % du muscle est atteint
- 2 → 25 à 50 % du muscle (Figure 10.B)
- 3 → 50 à 75 % du muscle
- 4 → 75 à 100% du muscle (Figure 10.C)

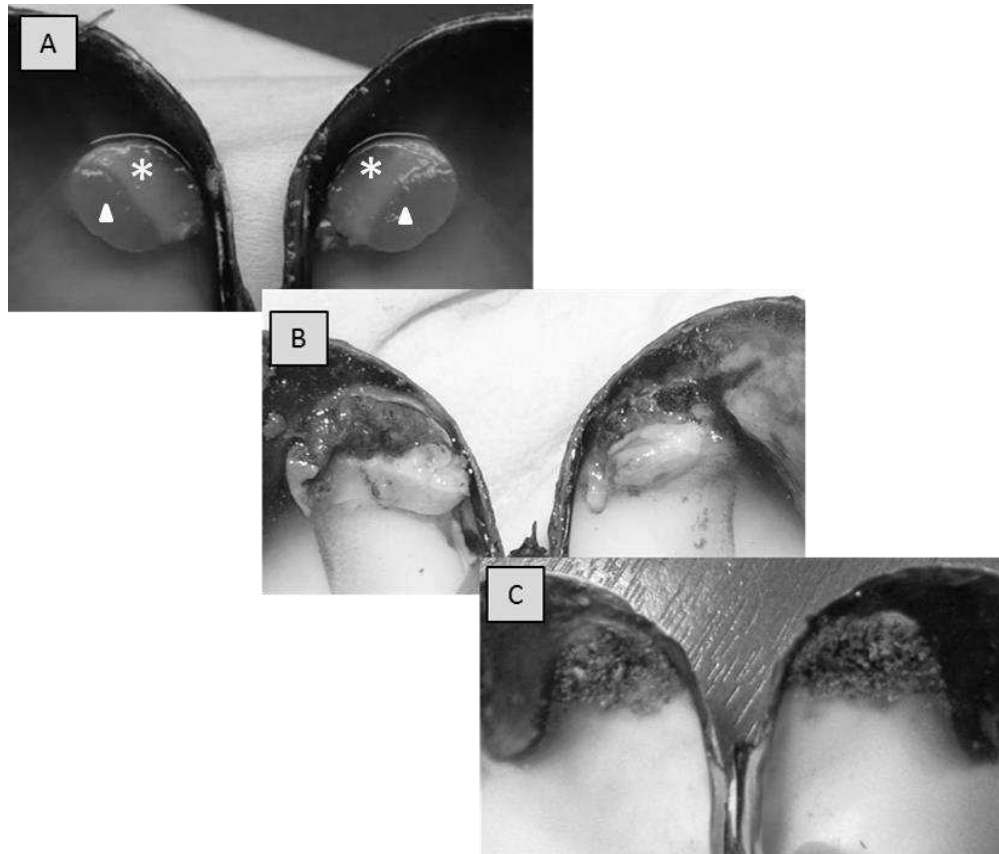


Figure 10. Muscles adducteurs postérieurs de palourdes à différents stades de la BMD. A- stade sain. Le muscle strié est caractérisé par une étoile blanche et le lisse par un triangle blanc. B- MPI = 2. C- MPI = 3 (D'après Dang et al. 2008)

Le muscle adducteur antérieur qui se trouve le plus enfoui, ainsi que les autres organes, ne présentent aucun signe visible de la maladie.

Des investigations plus poussées sur l'état du muscle ont été menées en microscopie optique (Figure 11). Trois stades ont été analysés pour déterminer la progression et l'impact de la maladie: sain, intermédiaire (MPI = 2) et avancé (MPI = 4).

- Stade sain (Figure 11.A). Le muscle présente une organisation normale. De nombreuses myofibrilles sont visibles sur la coupe.

- Stade intermédiaire (Figure 11.B). Les fibres musculaires sont désorganisées. Aucune structure distincte n'apparaît. Une importante infiltration hémocytaire est notable. Une forte réaction inflammatoire avec accumulation de granulocytes est observée : les granulocytomes (ou granulomes).

- Stade avancé (Figure 11.C). Plus aucune structure cellulaire n'est visible. Les fibres musculaires ainsi que les hémocytes ont disparu.



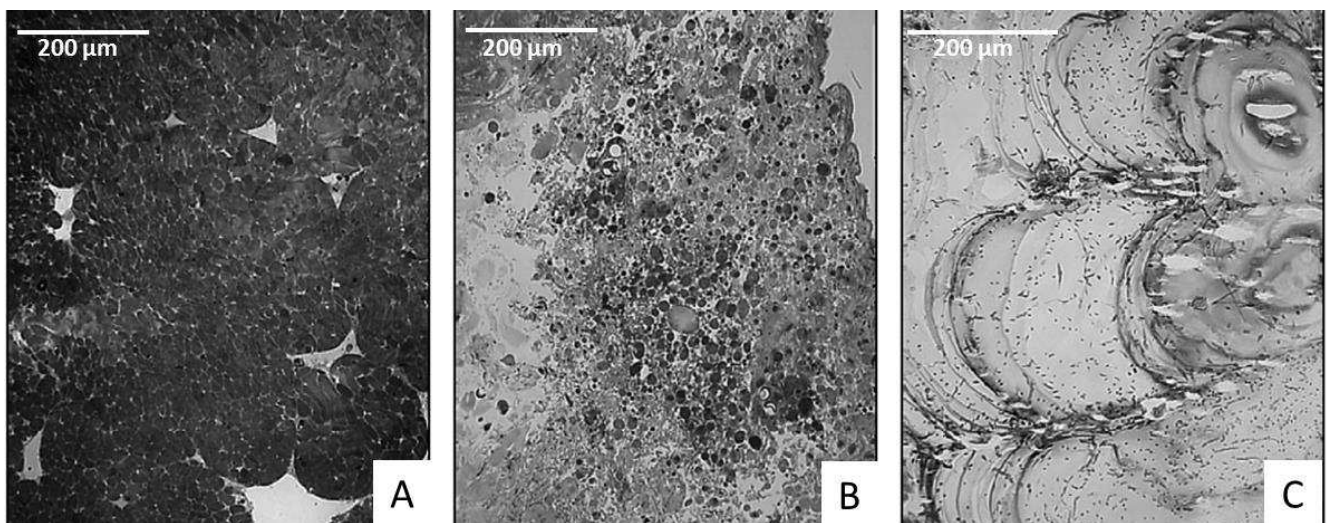


Figure 11. Coupes histologiques colorées au May-Grunwald-Giemsa de muscle adducteur postérieur sain (A), de MPI = 2 (B) et de MPI = 4 (C). Barre = 200 µm (D'après Dang et al. 2008)

### 2.3.1.2 Agent étiologique

Diverses approches ont été entreprises pour identifier l'agent responsable de la maladie. Les analyses sous loupe binoculaire et microscopie optique ont permis de noter l'absence de macroparasites tels que *Polydora* spp. (annélide polychète perforante), *Cliona* spp. (demosponge perforant), trématodes digènes et de microparasites comme les champignons, protozoaires et bactéries.

Des analyses par Polymerase Chain Reaction (PCR) avec des amorces universelles spécifiques ont permis d'éliminer définitivement la présence de champignons, de protozoaires et de bactéries.

Des analyses en microscopie électronique à transmissions ont permis de mettre en évidence de petites particules de type virale: VLPs (pour Virus-like particles) chez tous les individus atteints (Figure 12.B) mais pas chez les individus sains (Figure 12.A). Chez les individus malades, de fortes disruptions des fibres musculaires et des granulocytomes sont à nouveau observés.

Ces VLPs sont soit extracellulaires soit intracellulaires. Elles sont soit libres dans le cytoplasme (Figure 12.C), soit incluses dans des vésicules (Figure 12.D). Chez les individus aux stades de la maladie les plus avancés des structures où les particules semblent "ordonnées" sont observées. Ces amas ordonnés sont appelés des structures paracrystallines (Figure 12.E). La taille de ces particules, 25-40 nm, ainsi que leur forme icosaédrique et l'absence d'une enveloppe

suggèrent une appartenance à la famille des *picornaviridae*, des *parvoviridae* ou des *caliciviridae* (voir cependant les chapitres IV et VII).

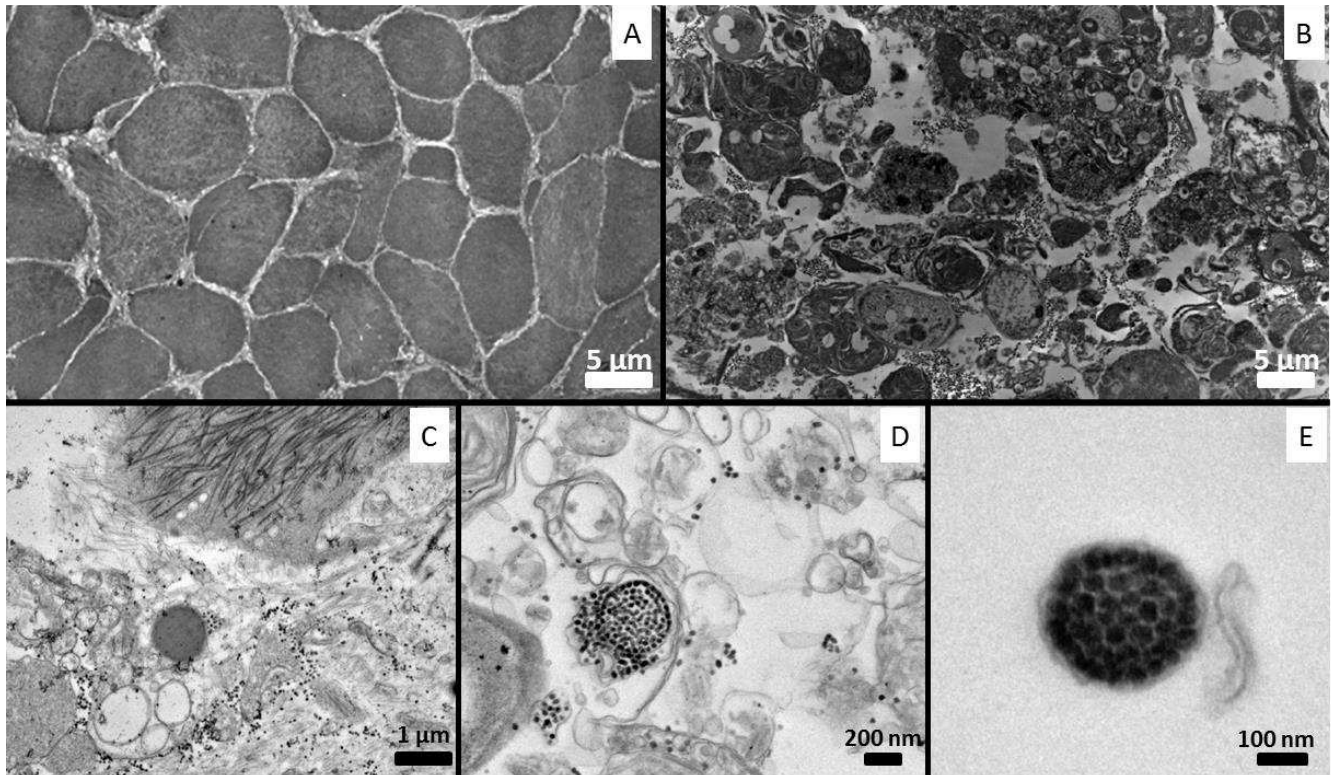


Figure 12. Coupes ultrafines observées en microscopie électronique à transmission. A- muscle sain (barre = 5  $\mu\text{m}$ ) B- muscle à un stade intermédiaire de la maladie (barre = 5  $\mu\text{m}$ ) C- Virus-like particules (VLPs) sur un stade intermédiaire de la maladie (1  $\mu\text{m}$ ) D- VLPs sur un stade avancé de la maladie (200nm) E- Structure paracrystalline des VLPs (barre = 100nm) (D'après Dang et al. 2009b)

### 2.3.1.3 Impacts sur l'hôte

La BMD a été découverte suite à de fortes mortalités observées sur le bassin d'Arcachon se traduisant par la présence de nombreuses coquilles à la surface du sédiment. En effet, la calcification du muscle adducteur postérieur est souvent visible même après la mort de l'individu (Figure 10.C)

La calcification du muscle adducteur postérieur va entraîner un dysfonctionnement de son activité et ainsi perturber le cycle de vie de l'animal. Ce muscle est responsable de l'activité d'ouverture et de fermeture des valves. La BMD va donc non seulement perturber les activités d'alimentation et de respiration de l'animal mais également le rendre plus vulnérable au parasitisme par des opportunistes (champignons, bactéries...), à la prédation et à la dessiccation. En effet, la perturbation du système d'ouverture/fermeture des valves va certainement entraîner la remontée à la surface des individus et donc une vulnérabilité plus importante face à des conditions

critiques (NB : d'autres stress comme des variations importantes de température et/ou de salinité entraînent la remontée à la surface des individus. Observations personnelles)

Aucun signe de réparation n'a pu être observé sur le terrain. Il semblerait que le développement de la maladie soit irréversible et conduise l'hôte à une mort certaine.

#### 2.3.1.4 Quelques chiffres...

Une première étude a montré que la BMD était présente sur 62% de la zone de répartition de la palourde japonaise, soulignant ainsi le caractère relativement global de la maladie à l'échelle du bassin d'Arcachon.

Une analyse comparative entre palourde de surface (position anormale) et palourdes enfouies supporte la théorie d'une remontée importante des palourdes atteintes de la maladie à la surface du sédiment. En effet, la prévalence est 3 fois plus importante chez les palourdes de surface que chez celles qui sont enfouies.

La différenciation "profondeur-surface" a également été suivie de façon mensuelle en termes de mortalité. Après 15 jours en laboratoire, les palourdes de surface présentaient une mortalité moyenne de 12,4% avec un pic de 82% contre 0,5% et un pic à 7% pour les individus de profondeur. Des calculs de mortalité réalisés sur un des sites les plus infectés du bassin montrent une mortalité naturelle (= mortalité hors pêche) des adultes à 95% imputable à la BMD.

La taille minimale d'apparition de la maladie est de 25 mm chez les individus de surface et 27 mm chez les individus enfouis.

L'analyse globale des MPI (Muscle Print Index) montre une représentation équivalente des 4 stades. Cependant on peut noter une prédominance de 36% pour le stade 1 contre 20%, 19% et 24% respectivement pour les stades 2,3 et 4.

#### 2.3.2 ...et ailleurs ?

Une des particularités de la BMD est son caractère très spécifique et très localisé.

Tout d'abord, les signes de la maladie ne sont visibles que sur le muscle adducteur postérieur. Aucun autre organe ne semble *a priori* touché.

Deuxièmement, seule la palourde japonaise est atteinte. En effet, des analyses réalisées sur des bivalves vivant en sympatrie comme la coque *Cerastoderma edule* ou la palourde européenne *V. decussata* ont montré l'absence de signe de la BMD (n = 200). Toutefois, l'absence de la maladie

chez *V. decussata* reste à confirmer puisque les individus récoltés étaient de 14 à 23 mm. Or chez la palourde japonaise, la taille minimale d'apparition de la maladie est de 25 mm.

Pour finir, cette maladie n'a pour l'heure été décrite que dans le bassin d'Arcachon. Deux épisodes de mortalités importantes, chez *V. decussata* en Espagne (Novoa & Figueras 2000) et *V. philippinarum* en Angleterre (Bateman et al. 2012) ont impliqués une suspicion d'agent étiologique de type Picornalike-virus et des signes cellulaires semblables à ceux de la BMD. Toutefois, aucune caractéristique macroscopique n'a été décrite.

Il existe toutefois un certain nombre de maladies affectant des bivalves et qui présentent des caractéristiques communes à celles de la BMD. Le tableau 1 rassemble une liste non exhaustive des principales maladies recensées proche de la BMD.

Tableau 1. Caractéristiques de maladies à virus détectées chez des bivalves marins. *nr* = non renseigné dans la publication.

Espèce concernée	Signes extérieurs	Signes cellulaires	Agent étiologique suspecté	Échantillonnage	Mortalités importantes	Référence
<i>Mytilus edulis</i>	<i>nr</i>	Granulocytomes Mitochondries anormales	Picornalike virus Amas paracrystallins ⊘ 27 nm	Danemark 1983-84 50-70mm	<i>nr</i>	Rasmussen 1986
<i>Perna canaliculus</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>nr</i>	Accumulation cellules basophiles Nécrose. Corps granuleux	Virus-like particles ⊘ 25-35 nm	Nouvelle Zélande 1994 Juvéniles + Adultes	Oui	Jones et al. 1996
<i>Paphies ventricosum</i>	<i>nr</i>	Vésicules d'endocytose	Virus-like particles ⊘ 22-36 nm	Nouvelle Zélande 1991-94 (Taille <i>nr</i> )	Oui	Hine et Wesney 1997
<i>Pecten novaezelandiae</i>	Pas de lésions apparentes	Vésicules d'endocytose Mitochondries enflées	Virus-like particles ⊘ 22-30 nm	Nouvelle Zélande 1990-93 23-110 mm	Oui	Hine et Wesney 1997
<i>Pinctada fucata martensii</i>	Atrophie et coloration jaune-marron du muscle et du manteau. Baisse de qualité des huîtres.	Fibres musculaires atrophées et nécrosées. Infiltration hémocytaire	Virus-like particles ⊘ 30 nm	Japon 1997-98 Juvéniles et adultes	Oui (annuelles)	Miyazaki et al. 1999
<i>Venerupis decussata</i>	<i>nr</i>	Contenu cytoplasmique réduit.	Picornalike virus ⊘ 27-35 nm	Espagne 1997-98 (Taille <i>nr</i> )	Oui (1997-98)	Novoa and Figueras 2000
<i>Pinctada margaritifera</i>	Lésions de la coquille, nécrose du muscle adducteur	Granulocytomes Fibres musculaires altérées	Virus-like particles ⊘ 40 nm	Polynésie française 1996-97 (taille <i>nr</i> )	Oui (1985)	Comps et al. 2001
<i>Cerastoderma edule</i>	<i>nr</i>	Néoplasie. Infiltration hémocytaire (manteaux, pied, gonade)	Picornalike virus Amas paracrystallins ⊘ 19-21 nm	Espagne 1999 (Taille <i>nr</i> )	Oui (1997)	Carballal et al. 2003
<i>Venerupis philippinarum</i>	<i>nr</i>	Cellules hypertrophiées. Infiltratio n hémocytaire	Picornalike virus ⊘ 25-30 nm	Angleterre 10 mm	Oui (2008)	Bateman et al. 2012

### **3. Problématique et organisation du manuscrit**

---

Selon l'office international des épizooties (OIE) une maladie émergente est une maladie grave récemment reconnue dont la cause peut ou non être déjà établie et qui est susceptible de se propager. De nombreuses définitions de maladie émergente sont disponibles. Toutefois, l'augmentation de l'incidence de la maladie dans une population donnée, une région donnée et une période donnée reste le dénominateur commun à toutes ces définitions (Toma & Thiry 2003). Les causes d'émergences de maladies sont multiples et font intervenir différents facteurs qui font échos à l'approche compartimentée de Snieszko (Saulnier et al. 2007) : i) l'agent pathogène, via les processus de mutations, l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence et les capacités de transmission et de multiplication; ii) l'environnement via le dérèglement d'un écosystème, le changement d'un paramètre biotique ou abiotique favorable pour l'agent infectieux; iii) l'hôte ou les espèces hôtes par l'affaiblissement de leurs capacités de défenses, de l'arrivée ou prolifération d'hôtes naïfs ou d'hôtes réservoirs et iv) des facteurs anthropiques comme le transfert d'espèces, les pratiques d'élevage ou la pollution du milieu.

La caractérisation des mécanismes d'infection, de la pathogénicité et des conditions d'expression d'un pathogène constitue évidemment un domaine de recherche fondamentale d'intérêt pour la compréhension des maladies. Mais il ne faut pas négliger *in fine* l'importance de ces informations sur les mesures de gestion à appliquer pour limiter la maladie et maintenir, dans le cas d'activités de productions, une économie durable et pérenne.

Dans la caractérisation d'une maladie, l'identification de l'agent responsable reste une étape essentielle. Toutefois, cette identification s'avère souvent difficile et reste insuffisante dans le cadre où une maladie se définit comme la résultante d'une interaction entre un pathogène, un hôte et un environnement (Snieszko 1974).

Dans cette optique, ce manuscrit de thèse se divise en deux parties. La première est consacrée à l'étude de la maladie et se divise en trois chapitres. La deuxième partie concerne la caractérisation de l'agent étiologique. Elle s'articule autour de quatre chapitres retraçant le raisonnement scientifique qui fut le nôtre dans la caractérisation de l'agent responsable de la BMD.

Dans la première partie consacrée à la BMD :

- Le **chapitre I** s'intéresse à l'influence des facteurs environnementaux sur la BMD mais également sur une autre maladie bien connue de la palourde japonaise et importante dans le bassin d'Arcachon, la perkinsose. Ce chapitre fait partie intégrante d'une publication comprenant un volet sur l'interaction coques/ trématodes digènes non présenté ici.

*Binias C, Do VT, Jude-Lemeilleur F, Plus M, Froidefond JM, de Montaudouin X (2013) Environmental factors contributing to the development of brown muscle disease and perkinsosis in Manila clams (Ruditapes philippinarum) and trematodiasis in cockles (Cerastoderma edule) of Arcachon Bay. Marine Ecology DOI: 10.1111/maec.12087*

- Le **chapitre II** traite d'un suivi spatio-temporel de la maladie. Des cartographies du bassin ont été réalisées en 2010 et 2012. Ces suivis nous permettent de déterminer l'évolution de la prévalence au cours du temps, mais également de détailler la distribution de la maladie. De plus suivi mensuel d'un an et demi nous a permis de mieux appréhender la dynamique du système hôte/parasite.

- Le **chapitre III** concerne l'impact de la maladie sur l'organisme hôte. L'effet de la maladie a été suivi au niveau physiologique, cellulaire et moléculaire. Ce chapitre fait l'objet d'une publication en cours de révision dans la revue Fish and Shellfish Immunology

*Binias C, Gonzalez P, Provost M, Lambert C, de Montaudouin X. Brown Muscle Disease: impact on Manila clam Venerupis (=Ruditapes) philippinarum biology. Fish & Shellfish Immunology, under review*

Dans la seconde partie du manuscrit, le **chapitre IV** concerne l'identification microscopique de l'agent étiologique. Il fait suite aux observations de particules de type viral déjà réalisées par Dang et al. (2009b). Ces particules ont ensuite été purifiées sur gradient de sucrose et des essais de clonage du matériel génomique ont été menés. Pour satisfaire au postulat de Koch et appréhender les mécanismes d'infestation de la maladie, une expérience de transmission de la maladie a été réalisée dans le **chapitre V**. Les difficultés et limites rencontrées au cours de cette infestation expérimentale nous ont amenés à considérer l'utilisation de culture cellulaire pour obtenir de grandes quantités de particules virales et pour appréhender les effets cytopathogènes de l'agent. Aucune lignée de mollusques bivalves n'étant disponible, le **chapitre VI** concerne donc des essais primaires pour l'obtention de primocultures de palourde japonaise pour des investigations futures.

Enfin le **chapitre VII** a été consacré à des approches de transcriptomique comparative entre individus sains et individus malades. Cet ultime chapitre représente une approche plus globale regroupant l'identification de l'agent étiologique mais aussi une étude de l'impact de la maladie sur le transcriptome de la palourde japonaise.



---

**PARTIE 1**

**La BMD : epizootiologie et  
impact sur l'hôte**

---





---

## Chapitre I

# Facteurs environnementaux contribuant au développement de la BMD et de la perkinsose chez la palourde japonaise (*Venerupis philippinarum*) dans le bassin d'Arcachon

---

*Extrait de la publication*

*"Binias C, Do VT, Jude-Lemeilleur F, Plus M, Froidefond JM, de Montaudouin X (2013) Environmental factors contributing to the development of brown muscle disease and perkinsosis in Manila clams (Ruditapes philippinarum) and trematodiasis in cockles (Cerastoderma edule) of Arcachon Bay. Marine Ecology DOI: 10.1111/maec.12087"*

## 1. Introduction

In coastal ecosystems, salinity is generally a strong driver of community structure (Blanchet et al. 2005). This is particularly true in systems such as estuaries where the gradient is obvious (Wolff 1973, Ysebaert & Herman 2002, Rybarczyk & Elkaim 2003). Typically, three types of faunal communities are encountered and these are associated with euhaline, polyhaline, mesohaline and oligohaline waters respectively. All of these have both pelagic (Herman et al. 1968, Orsi & Mecum 1986, Baretta & Malschaert 1988, David et al. 2006) and benthic components (Attrill & Rundle 2002; Ysebaert & Herman 2002). Parasite species may also display strong relationships to salinity gradients when their life cycles involve free-living stages sensitive to water mass characteristics. This has been described in protozoans like *Perkinsus* spp. that parasitize numerous mollusc species (Ahn & Kim 2001, La Peyre et al. 2006). When the host dies, the parasite transforms into a stage, the hypnospor, that spends some time in the water before being inhaled by a new host (Choi & Park 2010). The various species of the genus *Perkinsus* are known to be limited by low salinity (Leite et al. 2004).

In lagoons, however, salinity gradients are not always so pronounced and other structuring factors may interfere with the process. These include emersion rate, seagrass occurrence, and sediment grain size (Bachelet et al. 1996, Marzano et al. 2003, Blanchet et al. 2004). This results in a mosaic of communities where the major structuring factors are not always easy to detect. In relation to parasites, there is little knowledge on the factors that drive their distribution in these sheltered areas. For fishermen, such knowledge could contribute to identifying 'refuge areas' that are more or less exempt from infectious diseases (Hoffmann et al. 2009).

Arcachon Bay is a good system to illustrate and study these questions. It is a typical tidal lagoon with a cape sheltering most of the system and with freshwater inputs. Previous studies performed on free-living intertidal fauna demonstrated that the salinity gradient was not the only driver of the distribution of pelagic (Vincent 2002) and benthic communities (Bachelet & Dauvin 1993, Blanchet et al. 2004). Arcachon Bay also supports the highest production of Manila clam *Venerupis philippinarum* in France. This bivalve undergoes pathologies. Perkinsosis (*Perkinsus olseni*) is very prevalent in Manila clams in the whole bay, with no detected gradient (Dang et al. 2010a). Recently, in 2005, a new disease of the bivalve, Brown Muscle Disease (BMD), was described for the first time (Dang et al. 2008). The infectious agent is still unknown, although a virus is suspected (Dang et al.

2009b). Our specific aims were: 1) to describe a series of biotic and abiotic factors in Arcachon Bay in order to identify homogeneous entities, *i.e.* groups of stations that were defined by similar environmental characteristics with (salinity, temperature, emersion rate, grain-size median, seagrass biomass); 2) to assess levels of infection in clams; and 3) to identify environmental factors correlated with the various diseases. The general aim was to explore whether it is possible to identify 'hot spots' (accumulation of infections) or 'refuge areas' (sites free of pathogens) by measuring biotic and/or abiotic factors.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Study site

Arcachon Bay (44°40'N, 1°10'W) is a macrotidal (tidal range = 0.9-4.9) coastal lagoon situated on the South Western coast of France. This 156-km<sup>2</sup> ecosystem is connected to the Atlantic Ocean by a 2-3-km wide and 12-km long channel. Channels represent 41 km<sup>2</sup> of the lagoon surface and penetrate between large intertidal areas (115 km<sup>2</sup>). A significant proportion of these tidal flats (46 km<sup>2</sup>) is covered by *Zostera noltii* seagrass beds (Plus et al. 2010). Arcachon Bay receives freshwater inputs from the North-East and south but mainly from a river (Leyre) located in the South-Eastern end of the lagoon. The balance between marine and freshwater inputs and the slow renewal of water by tides induce salinity and temperature gradients (Robert et al. 1987).

### 2.2 Sampling procedure

In October and November 2009, a total of 39 stations were sampled along two axes (*i.e.* two subareas) drawn between the most seaward part of the lagoon and the most landward, within the Manila clam habitats (Figure I.1). Stations were sampled at low tide. Six 0.25-m<sup>2</sup> quadrats were sampled by hand to collect clams. When the number of collected individuals was insufficient, additional individuals were collected haphazardly in the immediately surrounding area. After all stations had been sampled, we selected 28-36-mm shell length individuals, a length range that was common to all stations, for further analysis. Sediment was sampled for analysis of organic matter and median grain-size. Pictures were taken for analysis of seagrass biomass (see below) using a Fujifilm FinePix S9500 camera at a resolution of 1600 x 1200 pixels.

### 2.3 Environmental factors

#### 2.3.1 Grain size and organic matter

At each station, the upper 3 cm of sediment was collected and subsequently analysed for grain-size distribution (wet sieving) and organic matter (loss of weight of dry sediment at 450°C for 4 h).

#### 2.3.2 Biomass of seagrass foliage

A rapid but reliable method of assessing the biomass of *Zostera noltii* leaves was developed for this study, during a preliminary sampling trip. Fifteen 15 cm x 15 cm quadrats were delicately laid over the sediment surface at low tide. These quadrats were visually selected to represent a large range

of vegetation cover, from 0% (bare sediment) to 100%. For each quadrat, a numerically identified photograph was taken from directly overhead, one meter above the surface.

Then, all leaves in the quadrat were cut at their base with scissors. Back at the lab, each sample was washed, weighed (fresh weight) and dried at 60°C for 48 hours to obtain a dry weight.

On each photograph, polygons corresponding to bare sediment were drawn using image analysis software. The surface of these polygons was automatically calculated and the seagrass cover was deduced from the quadrat surface. The leaf dry weights and the surface covers were correlated following logarithmic transformation of both variables (and after removing one picture without grass). The relationship was described by the following equation:

$$\ln(\text{DW}) = 1.450 \times \ln(S) - 1.733, \text{ with } R = 0.98 \text{ (n = 14 pictures)}$$

$$\text{where } \ln(S) = 0.690 \times \ln(\text{DW}) + 1.195$$

DW is *Zostera noltii* leaves dry weight in  $\text{g.m}^{-2}$  and S is the % of sediment covered by *Z. noltii*. The biomass in fresh weight (FW) could also be obtained

$$\text{FW} = 13.2 \times \text{DW}, R^2 = 0.95 \text{ (n = 15)}$$

Therefore from a numerically identified picture, it was possible to obtain a biomass with reliable precision. This method was more precise for lower seagrass covers; as vegetation cover approaches 100%, the method becomes less precise because 100% cover may correspond to many biomass values, depending on seagrass bed thickness.

The drawing of polygons allowed us to obtain the relationship between leaf biomass and seagrass cover but was highly time consuming for routine survey. Consequently, we used a line-drawing method in order to estimate foliage biomass more rapidly. This method consisted of drawing three equidistant lines across each numerical image and counting the intersections between lines and leaves. The 15 cm x 15 cm frame was placed with leaves perpendicular to one of the square sides and lines were drawn at right angle to leaves. The best correlations were found after logarithmic transformation of both variables (intersection and biomass) and described as follows;

$$\ln(\text{DW}) = 1.514 \times \ln(\text{mean number of intercepts per line}) - 1.9113, \text{ with } R = 0.98 \text{ (n = 14)}$$

This method was utilized to determine aerial biomass in the 39 investigated stations (10 frames per station). Less than ten minutes per photograph, including line drawing, were necessary to estimate aerial biomass.

### 2.3.3 Temperature, salinity, emersion time

Temperature, salinity and emersion rates for each sampling site were obtained by means of a mathematical model (MARS3D, (Lazure & Dumas 2008)), that had been previously applied and validated on Arcachon Bay (Plus et al. 2009). This three-dimensional hydrodynamic model calculates free surface height variations, current speed and direction, water temperature and salinity, at a 235 m resolution on the horizontal plane (10 meshes on the vertical) and at time steps ranging from 10 to 60 seconds. The model was launched for a three year period (November 2006 to November 2009), and the following parameters were recorded for each site:

- Temperature and salinity minima, maxima and means.
- Percent of time spent in emersion.
- Frequency histograms for temperature (percent of time spent at temperatures below the following thresholds: 8, 12, 16 and 20°C). These threshold values cover the range of values that is found in this area and allow detecting particularly low and high temperatures from “rare events”.
- Frequency histograms for salinity (percent of time spent at salinities below the following thresholds: 13, 28 and 34). These threshold values cover the range of a value that is found in this area and allow detecting particularly low and high salinities from “rare events”.

Boundary conditions were provided by the global tidal solution FES99 (Lefèvre et al. 2002) and the atmospheric forcing parameters – air temperature, atmospheric pressure, nebulosity, relative humidity and surface wind stress – were provided by the ARPEGE model (Météo-France).

Comparisons between available ground-truth values and model simulations were performed in order to validate the mathematical model for the study period (from November 2006 to November 2009). Empirical temperature and salinity data were taken from the ARCHYD database (Ifremer), selecting four stations located along the clam sampling axes (Figure I.1). Sea surface height (SSH) observations at the Eyrac tide gauge (Figure I.1) were provided by the REFMAR website ([refmar.shom.fr](http://refmar.shom.fr)) and remain the property of the SHOM (Naval Hydrographic and Oceanographic Service) and the Gironde DDTM (Sea and Territory Departmental Directorate). Model evaluation was performed following Piñeiro et al. (2008), regressing observed vs. predicted values and testing the significance of slope = 1 and intercept = 0. This analysis was complemented by RMSD (root mean squared deviation) and EFF (model efficiency) calculations:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{i\text{mod}} - Y_{i\text{obs}})^2}{n}}$$

$$Eff = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_{i\text{mod}} - Y_{i\text{obs}})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_{i\text{obs}} - \bar{Y}_{\text{obs}})^2}$$

where  $Y_{i\text{mod}}$  and  $Y_{i\text{obs}}$  are respectively the predicted and observed values and  $n$  is the total number of values.

Table I.1. Regressions parameters (slope  $a$  and bias  $b$ , for the  $Y_{\text{obs}} = aY_{\text{mod}} + b$  equation), coefficient of determination ( $r^2$ ), Theil's partial inequality coefficients ( $U_{\text{bias}}$ ,  $U_{\text{slope}}$  and  $U_{\text{error}}$ , are the proportions of observed variance not explained by the predicted values but due to respectively, mean differences between observed and predicted values, slope error and unexplained variance), root mean squared deviation (RMSD, expressed in the same units as the variables) and model efficiency (Eff, the closer Eff is to 1, the better is the model), for observed vs. predicted variables (temperature, TEMP, salinity, SAL and sea surface height, SSH)

	SSH	Temperature	Salinity
a	1.008	0.958	0.910
Significance of test a=1	0.20	0.09	0.18
b	0.016	0.376	3.086
Significance of test b=0	0.33	0.35	0.16
Degree of freedom	915	34	34
$r^2$	0.97	0.98	0.85
$U_{\text{bias}}$ (%)	0.034	0.125	0.039
$U_{\text{slope}}$ (%)	0.002	0.071	0.049
$U_{\text{error}}$ (%)	0.964	0.804	0.912
RMSD	0.19	0.78	0.79
EFF	0.96	0.98	0.84

Table I.1. summarizes the results of the model validation. Observed vs. predicted values regressions showed that the model behaved satisfactorily. Best model performances were obtained for sea surface elevation and temperature, with a very high percentage of variance in observed values explained by the model (respectively 97% and 98%). The worst model performance was obtained for salinity but the coefficient of determination still remains high (85%). All tests for slope=1 and intercept=0 were passed and model efficiency was near 1. Theil's partial coefficients show that most of the errors in model predictions were due to unexplained variance and not to bias or to misleading. Temperature, salinity and SSH root mean squared deviations were 0.78°C, 0.79 and 19 cm, respectively.



## 2.4 Bivalve models and associated pathology

### 2.4.1 Manila clam and *Perkinsus*

All collected Manila clams (*Venerupis philippinarum*) belonging to shell length class 28-36 mm were opened (34 stations out of 39 investigated stations harboured Manila clams with adequate shell length) and gill samples were excised. Five gills from clams with identical lengths were pooled and weighed for analyses of *Perkinsus* infection levels as determined by the FTM (fluid thioglycollate medium) assay (Ray 1966). Depending on clam availability, between 2 and 6 pools (except 1 pool in a single station (n°21)) were obtained. For induction of prezoosporangia (hypnospores), gill samples were placed in separate 15 mL tubes containing 9.5 mL FTM supplemented with 66  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin, 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  penicillin G and, 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nystatin (final concentrations), to prevent bacterial and fungal activity. The tubes were incubated at room temperature for 7 days, in the dark. After incubation, the samples were stored at 4°C until hypnospore enumeration. To lyse tissues, samples were centrifuged at 664g for 10 min. Pellets were added with 5 mL 2N NaOH, and incubated at 60°C for at least 1 hour. This step was repeated before pellets were rinsed twice with 10 mL 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). Final pellets were resuspended in 1 mL PBS and hypnospores were counted twice using a Malassez counting chamber.

The concentration of *Perkinsus* was correlated to the different variables of the environment (Pearson correlation, after verifying normality of residuals), and was compared among the four spatial groups (Kruskal Wallis test due to heteroscedasticity) and between the two axes, *i.e.* between the two subareas of the lagoon (Student *t*-test) (Statistica 7 software).

### 2.4.2 Manila clam and BMD

All collected clams belonging to the 28-36-mm shell length class were opened and an index of the pathology (Muscle Print Index, MPI) estimated. On the posterior adductor muscle (the only affected one), the MPI was used to designate the surface colonized by the brown muscle print on a scale of 0 to 4 as follows: 0 (healthy), 1 (0-25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%) and 4 (75-100%). When both valves displayed different pathology indices, the highest category was selected to characterize the stage of BMD. Prevalence was defined as the percentage of infected hosts (Bush et al. 1997).

### 3. Results

#### 3.1 Environmental factors

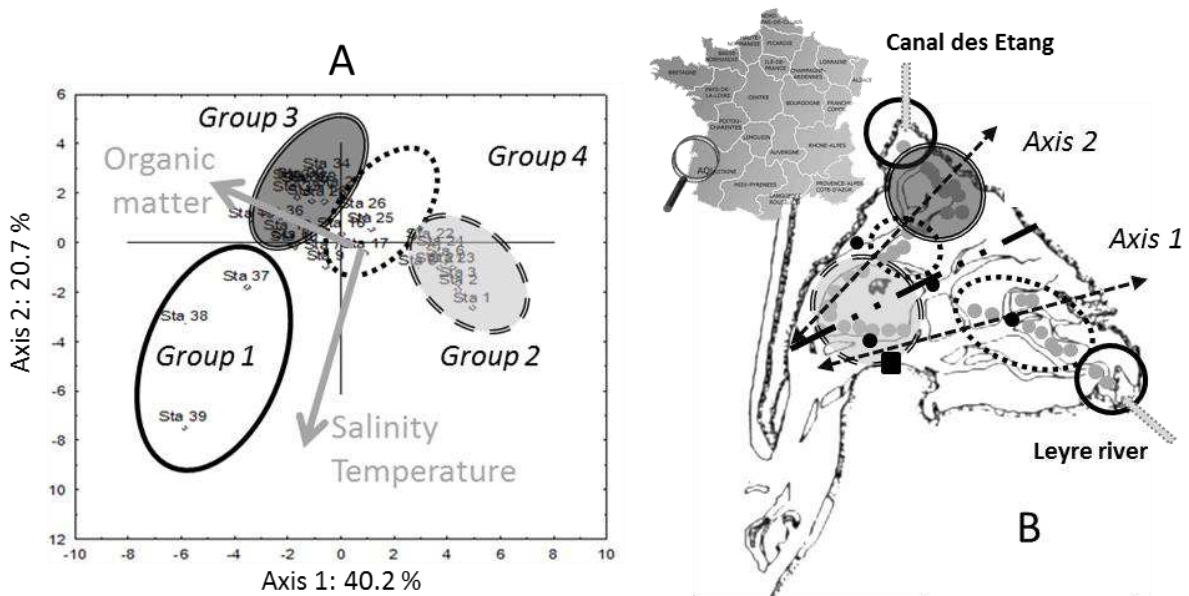


Figure I.1. Principal Component Analysis (PCA) based on 21 environmental factors (A) from 33 stations (B). Four groups can be separated. Organic Matter content in the sediment contributed to Axis 1, while salinity and temperature contributed to Axis 2. Black disks represent stations that were surveyed within ARCHYD network in order to obtain ground-truth values of salinity and temperature for model validation. Black square situates Eyrac tide gauge to calibrate sea surface height with the model and to deduce emersion time

The Principal Component Analysis separated 4 spatial groups (Figure I.1A). Group 1 isolated a small number of stations at the mouth of the two freshwater inputs (Canal des Etangs and Leyre) (Figure I.1B). This group was characterized by low mean salinity (22.6), high frequency of  $T < 16^{\circ}\text{C}$  (50%), high organic matter and silt and clay contents in the sediment (7.8 and 38.5%, respectively), null emersion time, and low seagrass coverage (7%) (Table I.2). Group 2 gathered stations in oceanic position with high median grain size (191  $\mu\text{m}$ ), high mean salinity (32.8), mean temperature similar to elsewhere in the lagoon ( $17^{\circ}\text{C}$ ) but with low occurrence of cold events, *i.e.* low frequency of  $T < 8^{\circ}\text{C}$  (4.2%), low organic matter and silt and clay content in the sediment (3.2 and 16.3%, respectively) (Figure I.1) (Table I.2). Groups 3 and 4 displayed medium mean salinity (30.1), medium frequency of  $T < 8^{\circ}\text{C}$  (7.7%) (Table I.2). Axis 2 displayed a higher percentage of silt and clay, organic matter in the sediment and emersion time and more extreme water temperatures than Axis 1 (Table I.3).

Table I.2. Different characteristics of the environment averaged for each of the four groups that were defined by the Principal Component Analysis (Figure I.2). ANOVA (F value) or Kruskal Wallis tests (H) were performed to compare values among groups. Superscript letters gather groups that are similar for a given parameter, values that are different from values of the three other groups ( $p < 0.05$ ) are in bold and italic

		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	F	H	$p$
Sediment	Median ( $\mu\text{m}$ )	103 <sup>b</sup>	<b>191.2<sup>a</sup></b>	96.5 <sup>b</sup>	108.3 <sup>b</sup>		13.23	<b>0.004</b>
		$\pm 52.8$	$\pm 85.3$	$\pm 37.8$	$\pm 22.5$			
	Silt (%)	38.5 <sup>a</sup>	<b>16.3<sup>b</sup></b>	38.8 <sup>a</sup>	29.5 <sup>a</sup>	8.32		<b>&lt;0.001</b>
		$\pm 11.3$	$\pm 16.3$	$\pm 3.2$	$\pm 8.3$			
Organic matter (%)		7.8 <sup>bc</sup>	<b>3.2<sup>a</sup></b>	<b>9.1<sup>c</sup></b>	<b>6.2<sup>b</sup></b>	7.91		<b>0.000</b>
		$\pm 2.6$	$\pm 2.5$	$\pm 1.3$	$\pm 2.5$			
Seagrass cover (%)		6.2 <sup>a</sup>	72.2 <sup>b</sup>	40.1 <sup>ab</sup>	44.9 <sup>ab</sup>	6.24		<b>0.002</b>
		$\pm 10.8$	$\pm 22.7$	$\pm 23.4$	$\pm 26.7$			
Salinity	Mean	<b>22.5<sup>c</sup></b>	<b>32.8<sup>b</sup></b>	30.3 <sup>a</sup>	29.9 <sup>a</sup>		23.16	<b>&lt;0.001</b>
		$\pm 3.7$	$\pm 0.3$	$\pm 0.3$	1.4			
	F <13	16.4 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.1 <sup>ab</sup>	0.3 <sup>ab</sup>		14.64	<b>0.002</b>
		$\pm 8.7$	$\pm 0$	$\pm 0.3$	$\pm 0.9$			
	F <28	<b>66.6<sup>a</sup></b>	1.8 <sup>b</sup>	20.1 <sup>b</sup>	22.7 <sup>b</sup>		22.87	<b>&lt;0.001</b>
	$\pm 19.0$	$\pm 0.7$	$\pm 3.9$	$\pm 13.1$				
F <34		99.9 <sup>a</sup>	<b>75.1<sup>b</sup></b>	99.8 <sup>a</sup>	98.8 <sup>a</sup>		21.92	<b>&lt;0.001</b>
		$\pm 0.0$	$\pm 7.8$	$\pm 0.1$	$\pm 1.5$			
Temperature	Mean	16.7 <sup>a</sup>	16.7 <sup>a</sup>	17.0 <sup>b</sup>	17.0 <sup>b</sup>	31.80		<b>&lt;0.001</b>
		$\pm 0.2$	$\pm 0.1$	$\pm 0.1$	$\pm 0.1$			
	Minimal	1.2 <sup>bc</sup>	<b>3.1<sup>a</sup></b>	0.8 <sup>c</sup>	1.9 <sup>b</sup>	9.55		<b>&lt;0.001</b>
		$\pm 0.4$	$\pm 0.9$	$\pm 0.5$	$\pm 0.9$			
	Maximal	34.4	33.1	34.1	32.2	1.36		0.274
		$\pm 0.5$	$\pm 2.2$	$\pm 2.1$	$\pm 2.6$			
	F < 8°C	9.5 <sup>a</sup>	<b>4.2<sup>b</sup></b>	7.9 <sup>a</sup>	7.5 <sup>a</sup>		23.74	<b>&lt;0.001</b>
		$\pm 0.3$	$\pm 1.1$	$\pm 0.2$	$\pm 0.7$			
F <12°C	31.6 <sup>a</sup>	<b>27.1<sup>b</sup></b>	28.0 <sup>a</sup>	28.1 <sup>a</sup>		23.11	<b>&lt;0.001</b>	
	$\pm 0.7$	$\pm 0.2$	$\pm 0.2$	$\pm 0.5$				
F <16°C	50.4 <sup>a</sup>	48.4 <sup>ab</sup>	48.0 <sup>b</sup>	48.3 <sup>ab</sup>		12.13	<b>0.006</b>	
	$\pm 0.7$	$\pm 0.4$	$\pm 0.2$	$\pm 0.3$				
F < 20°C		62.7 <sup>ac</sup>	63.1 <sup>a</sup>	59.5 <sup>b</sup>	59.9 <sup>cb</sup>		23.07	<b>&lt;0.001</b>
		$\pm 1.3$	$\pm 1.4$	$\pm 0.3$	$\pm 0.7$			
Current F<0.25m/s		93.3	95.6	91.3	82.2		4.97	0.174
		$\pm 6.9$	$\pm 4.5$	$\pm 10.4$	$\pm 15.7$			
% Emersion time		0.0 <sup>a</sup>	30.9 <sup>b</sup>	32.9 <sup>b</sup>	13.0 <sup>a</sup>	6.26		<b>0.002</b>
		$\pm 0$	$\pm 16.9$	$\pm 11.4$	$\pm 15.1$			
Clam density (ind/m <sup>2</sup> )		16.2 <sup>ab</sup>	6.3 <sup>a</sup>	51.4 <sup>b</sup>	23.9 <sup>ab</sup>		10.84	<b>0.012</b>
		$\pm 28.1$	$\pm 7.9$	$\pm 41.7$	$\pm 18.6$			
Distance (km)	Leyre	5.9 <sup>ab</sup>	13.8 <sup>a</sup>	12.4 <sup>ab</sup>	8.2 <sup>b</sup>		10.66	<b>0.013</b>
		$\pm 8.1$	$\pm 1.1$	$\pm 1.3$	$\pm 4.3$			
	Canal des Etangs	9.8 <sup>ab</sup>	8.2 <sup>ab</sup>	3.3 <sup>a</sup>	8.2 <sup>b</sup>		9.07	<b>0.028</b>
		$\pm 8.1$	$\pm 0.9$	$\pm 1.3$	$\pm 4.1$			
Atlantic Ocean		12.7 <sup>a</sup>	<b>3.0<sup>b</sup></b>	9.6 <sup>a</sup>	9.5 <sup>a</sup>		22.06	<b>&lt;0.001</b>
		$\pm 1.9$	$\pm 1.0$	$\pm 0.4$	$\pm 1.9$			

Table I.3. Different characteristics of the environment in both axes (Figure I.1). Student t-test (t value) was performed to compare values between axes. Values that are different ( $p < 0.05$ ) are in bold and italic

		Axis 1	Axis 2	t	p
Sediment	Median ( $\mu\text{m}$ )	131.9	127.4	0.20	0.838
	Silt (%)	23.5	32.1	<b>-2.12</b>	<b>0.041</b>
	Organic matter (%)	4.3	7.3	<b>-3.11</b>	<b>0.004</b>
	Seagrass cover (%)	44.6	51	-0.60	0.550
Salinity	Mean	29.5	30.9	-1.38	0.178
	F <13	2.6	0.8	1.02	0.315
	F <28	25.2	15.2	1.49	0.144
	F <34	91.2	92.3	-0.27	0.790
Temperature	Mean	16.9	16.9	0.30	0.765
	Minimal	2.5	1.7	<b>2.28</b>	<b>0.029</b>
	Maximal	32.1	33.7	<b>-2.05</b>	<b>0.048</b>
	F < 8°C	6.6	6.9	-0.39	0.700
	F <12°C	28.2	27.9	0.69	0.489
	F <16°C	48.6	48.3	1.33	0.191
	F < 20°C	61.3	60.9	0.57	0.573
Current F<0.25m/s	85.3	91.9	-1.53	0.135	
% Emersion time	11.4	28.3	<b>-3.16</b>	<b>0.003</b>	
Clam density (ind/m <sup>2</sup> )	17.6	27.7	-1.11	0.273	
Distance (km)	Leyre	7.2	13.3	<b>-5.10</b>	<b>&lt;0.001</b>
	Canal des Etangs	10.9	4.5	<b>7.83</b>	<b>&lt;0.001</b>
	Atlantic Ocean	8.4	7.4	0.83	0.414

### 3.2 Manila clam and Perkinsosis

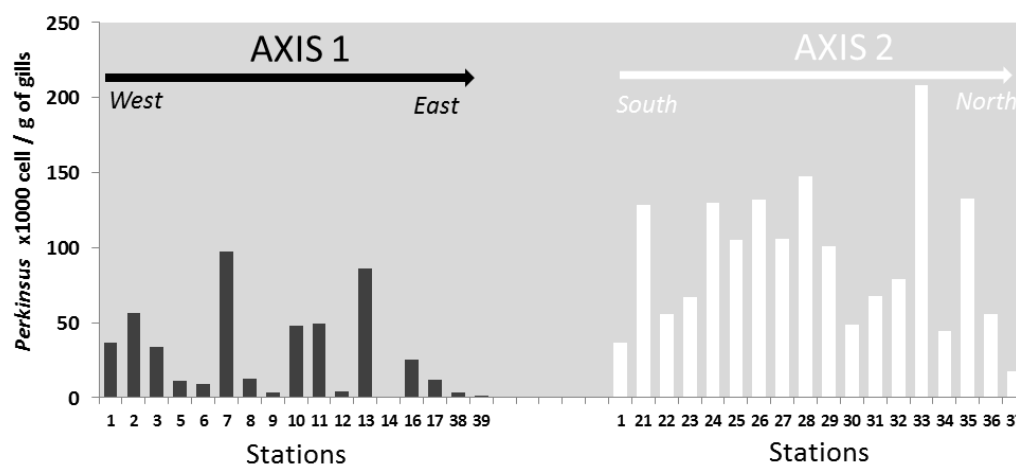


Figure I.2. Abundance of Perkinsus (cells/g (fresh weight) of gills) per station in Arcachon Bay

The mean concentration of *Perkinsus* in the bay was 62,000 cells.g<sup>-1</sup> (gill fresh weight FW) and could reach 209,000 cells.g<sup>-1</sup> (gill FW) (station 33, Axis 2, Figure I.2). It was positively correlated to organic matter concentration in the sediment, percentage of emersion, and distance to Leyre River and was

negatively correlated to frequency of  $T < 16^{\circ}\text{C}$  and distance to Canal des Etangs (Table I.4). There was a significant difference of *Perkinsus* concentration among spatial groups (Kruskal Wallis,  $df = 3$ ,  $H = 22.58$ ,  $p < 0.001$ ), Group 1 ( $7,400 \text{ cells.g}^{-1}$  (gill FW)) being different from Groups 2, 3 and 4 that displayed similar infection ( $70,193 \text{ cells.g}^{-1}$  (gill FW)). *Perkinsus* abundance was three times higher in Axis 2 (mean =  $95,701 \text{ cells.g}^{-1}$  gill FW) than in Axis 1 (mean =  $28,917 \text{ cells.g}^{-1}$  gill FW) (Student *t*-test,  $df = 33$ ,  $t = -4.62$ ,  $p < 0.001$ ).

Table I.4. Correlation between 1) *Perkinsus* concentration, Brown Muscle Disease (BMD) prevalence, BMD's Muscle Print Index (MPI) and 2) different parameters of the environment ( $N = 34$ ). Significant correlations ( $p < 0.05$ ) are in bold and italic. *R* = Pearson correlation coefficient

		Perkinsus concentration (Cells/g of gills)		BMD			
		<i>R</i>	<i>p</i>	Prevalence (%)		MPI	
		<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
Sediment	Median ( $\mu\text{m}$ )	-0.04	0.829	-0.27	0.141	-0.28	0.119
	Silt (%)	0.25	0.149	<b><i>0.45</i></b>	<b><i>0.010</i></b>	<b><i>0.39</i></b>	<b><i>0.025</i></b>
	Organic matter (%)	<b><i>0.35</i></b>	<b><i>0.040</i></b>	<b><i>0.52</i></b>	<b><i>0.003</i></b>	<b><i>0.42</i></b>	<b><i>0.015</i></b>
	Seagrass cover (%)	0.09	0.594	0.07	0.713	-0.35	0.051
Salinity	Mean	0.29	0.101	-0.10	0.580	-0.26	0.145
	F <13	-0.31	0.073	0.08	0.672	-0.03	0.865
	F <28	-0.27	0.127	0.07	0.681	0.29	0.098
	F <34	0.03	0.875	<b><i>0.37</i></b>	<b><i>0.039</i></b>	<b><i>0.72</i></b>	<b><i>&lt;0.001</i></b>
Temperature	Minimal	-0.29	0.093	<b><i>-0.37</i></b>	<b><i>0.034</i></b>	<b><i>-0.46</i></b>	<b><i>0.008</i></b>
	Maximal	0.29	0.090	0.12	0.514	-0.02	0.900
	Mean	0.09	0.614	0.12	0.6644	<b><i>0.66</i></b>	<b><i>&lt;0.001</i></b>
	F < 8°C	0.00	0.990	0.32	0.071	<b><i>0.65</i></b>	<b><i>&lt;0.001</i></b>
	F <12°C	-0.26	0.131	0.18	0.330	0.21	0.245
	F <16°C	<b><i>-0.35</i></b>	<b><i>0.043</i></b>	-0.00	0.987	-0.24	0.176
	F < 20°C	-0.17	0.344	-0.23	0.213	<b><i>-0.73</i></b>	<b><i>&lt;0.001</i></b>
Current F<0.25m/s	0.09	0.626	-0.16	0.390	-0.20	0.270	
% Emersion time	<b><i>0.34</i></b>	<b><i>0.048</i></b>	0.13	0.491	0.03	0.875	
Clam density (ind/m <sup>2</sup> )	0.10	0.569	-0.12	0.502	<b><i>0.37</i></b>	<b><i>0.037</i></b>	
Distance (km)	Leyre	<b><i>0.43</i></b>	<b><i>0.011</i></b>	0.28	0.114	-0.28	0.113
	Canal des Etangs	<b><i>-0.51</i></b>	<b><i>0.002</i></b>	<b><i>-0.60</i></b>	<b><i>&lt;0.001</i></b>	-0.20	0.260
	Atlantic Ocean	-0.14	0.422	0.20	0.264	<b><i>0.62</i></b>	<b><i>&lt;0.001</i></b>

### 3.3 Manila clam and Brown Muscle Disease

The mean Brown Muscle Disease (BMD) prevalence per station in Manila clams throughout the bay was 11% (Figure I.3). BMD prevalence and Muscle Print Index (MPI) were positively correlated with silt and organic matter contents in the sediment and with salinity frequency  $S < 34$ . They were

negatively correlated with minimal temperatures. Besides, MPI was positively correlated with mean water temperature and with Manila clam density (Table I.4). However, the influence of freshwater input was not similar between Canal des Etangs and Leyre. There was no difference of prevalence between spatial groups (one-way ANOVA,  $F_{3,28} = 2.03$ ,  $p = 0.13$ ). However, Muscle Print Index increased from the most oceanic spatial group (G2) ( $MPI_{\text{mean}} = 0.8$ ) to the more continental ones (G3 and G4) ( $MPI_{\text{mean}} = 2.4$ ) groups (one-way ANOVA,  $F_{3,28} = 11.74$ ,  $p < 0.001$ ). Prevalence was 3.6 times higher along Axis 2 (16.1%) (See figure I.1 for localisation of both axes) than along Axis 1 (4.5%) (U-Mann & Whitney,  $Z = -2.70$ ,  $p = 0.007$ ) (Figure I.3). MPI was similar in both axes (1.84) (U-Mann & Whitney,  $Z = -1.55$ ,  $p = 0.12$ ).

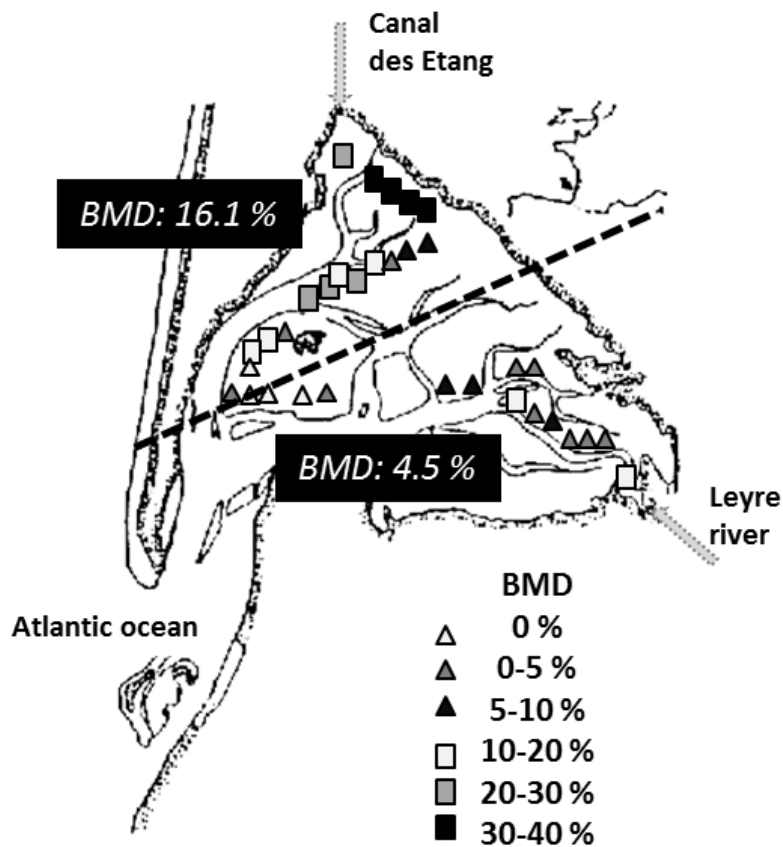


Figure I.3. Brown Muscle Disease (BMD) prevalence per station in Arcachon Bay. Mean BMD prevalence per axis (i.e. subarea) is mentioned

#### 4. Discussion

The aim of the study was to correlate the distribution of two types of Manila clam diseases within a lagoon (Arcachon Bay) in order to identify the main drivers. Salinity is often cited as a strong contributing factor (Ahn & Kim 2001, Elandalloussi et al. 2008) but many confounding factors may intervene along the gradient. The unusual feature of Arcachon Bay was the presence of two major freshwater inputs that induce a bi-directional salinity-temperature gradient, East-West and North-South. We demonstrated that the effect of salinity was restricted to a very narrow area around the mouth of the river, for perkinsosis only. Indeed, *Perkinsus* concentration was significantly lower than elsewhere in Group 1 only, corresponding to 3 stations near river mouths. The distribution of both diseases was explained less within “oceanic vs. continental” axis than between both northwest and southwest subareas of the lagoon. This suggests that factors other than salinity were contributing.

The Principal Component Analysis discriminated groups of stations in accordance with what could be expected in such an ecosystem: an oceanic-influenced group (Group 2), a continent-influenced group (Group 1) and two intermediates groups (Groups 3 and 4) (Bouchet 1993).

The mean abundance of perkinsosis infection was high compared to previous studies (Lassalle et al. 2007) but was lower than that assessed in Arcachon Bay in 2006 (96,000 cells.g<sup>-1</sup> (gill FW) (Dang et al. 2010a). This difference can be explained by the distribution of sampling stations, which in the present study took into account a broader area including stations with low infection. Salinity is an important factor structuring the abundance of *Perkinsus* spp. in some locations (Leite et al. 2004). For *P. olsenii*, the optimal salinity range is 25-35 (Auzoux-Bordenave et al. 1995) and high infection generally corresponds to high salinity (Burreson & Ragone-Calvo 1996, Cigarría et al. 1997, Park & Choi 2001). In Arcachon Bay a similar gradient was formerly obtained (Dang et al. 2010a) but mainly due to stations sampled near freshwater inputs. In the present study, the refuge function of low-salinity areas was evident (Group 1), but concerned less than 5% of the axis lengths. It should be determined if these low salinity areas are effective for commercially relevant growth rates in the shellfish. The salinity gradient out of these areas was not high enough to induce a perkinsosis infection gradient. Unexpectedly, the highest difference in perkinsosis infection was observed between Axes 1 and 2. The environmental characteristics that were significantly different between axes involved sediment and emersion. The highest content in silt and clay, and organic matter in the sediment coincided with the highest emersion rate, the highest extreme temperatures and

eventually the highest perkinsosis infection (Axis 2). Higher infection in muddy sediment than in sands was already reported (Choi et al. 2002). Our hypothesis is also that the highest emersion rate (higher average hypsometric level) is due to (and/or is the consequence) a smaller input of oceanic water during flood-tides, a lower water turn-over and a higher sedimentation of fine particles. This lower turn-over is consistent with an unpublished report that 1/3 of the water mass transits through Axis 2 against 2/3 through Axis 1 (SOGREAH 2001). That would increase the retention of *Perkinsus* hypnospores and facilitate infection between clams.

A similar observation was made with Brown Muscle Disease (BMD). Interpretation is more difficult due to the lack of knowledge concerning the infectious agent which might be a virus (Dang et al. 2009b). Here again, Axis 2 displayed higher prevalence in relation to sediment characteristics (but similar Muscle Print Index (MPI)). This axis was also characterized by higher clam densities (+60%, although  $p > 0.05$ ) which could facilitate disease transmission.





---

## Chapitre II

# Suivi Spatio-temporel de la BMD sur les palourdes du bassin d'Arcachon

---

*Collaborations :*

*Nathalie Caill-Milly, Florence Sanchez et Muriel Lissardy. IFREMER Laboratoire Ressources Halieutiques Aquitaine – Anglet*

*Alice Khayati et Jean-Michel Labrousse. Comité départemental des pêches et des élevages marins*

## 1. Introduction

A l'échelle du bassin d'Arcachon, la maladie du muscle marron (BMD), pathologie émergente découverte en 2005 (Dang et al. 2008), est impliquée dans des mortalités importantes de la palourde japonaise et inquiète tout particulièrement le secteur de la pêche professionnelle (cf. introduction générale 2.3)

Une première cartographie de la maladie, réalisée en 2006 (Dang & de Montaudouin 2009) sur 50 stations réparties sur la zone la plus interne du bassin d'Arcachon fait état d'une maladie affectant 62% des sites étudiés et d'une prévalence généralement inférieure à 20% pour chaque site (individus de 30-40 mm). Une seconde étude, réalisée en 2009 selon 2 radiales nord-sud et est-ouest (Binias et al. 2013- Chapitre I) présentait un découpage du bassin en deux sous-bassins Nord et Sud avec une prévalence de la BMD 3 fois plus élevée dans le sous-bassin Nord (individus de 28-36 mm). Ces deux études reposaient sur des stratégies différentes (nombre d'échantillons, distribution, engin, saison) et sont à ce titre difficile à comparer.

Le but de cette étude est de comparer deux cartographies de la BMD menées selon la même stratégie, réalisées en 2010 et 2012, pour estimer l'évolution spatio-temporelle de la maladie. L'évolution globale de la prévalence sera suivie avec une attention toute particulière accordée à l'évolution en fonction de la taille des individus. Une comparaison entre les deux sous-bassins Nord et Sud précédemment déterminés (Figure II.1) sera également effectuée sur les cartographies 2010 et 2012. Une analyse plus fine sur une cohorte a également été réalisée pour approfondir la connaissance de la dynamique du système maladie-hôte.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Site d'étude

Cf Introduction générale 2.2, page 10.

### 2.2 Campagnes annuelles d'échantillonnage

Les palourdes japonaises *Venerupis philippinarum* ont été collectées dans le cadre des campagnes d'évaluation du stock de palourdes réalisées par le Comité Départemental des Pêches Maritimes et Elevages Marins (CDPMEM), l'IFREMER d'Anglet et les pêcheurs professionnels.

Les campagnes 2010 (24 mai-3 juin et 9-15 juin) et 2012 (2-9 juin et 19-25 juin) ont été analysées pour cette étude avec respectivement 5 716 et 6 437 palourdes japonaises récoltées.

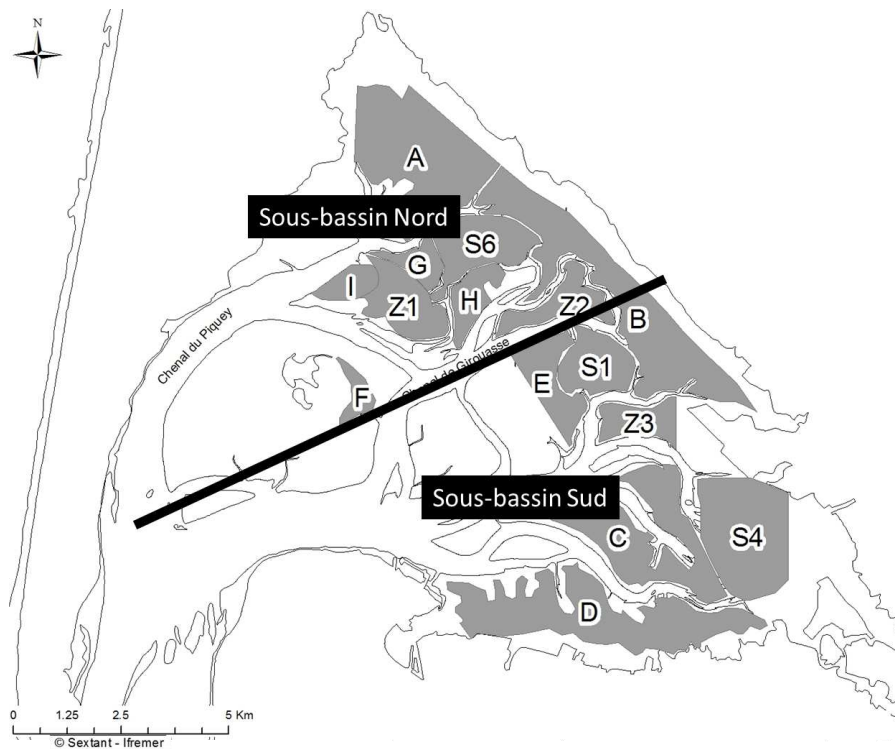


Figure II.1. Carte du bassin d'Arcachon avec en gris l'ensemble des strates échantillonnées lors des campagnes 2010 et 2012. La barre noire délimite les sous-bassins Nord et Sud. Dans les analyses, la strate B est considérée pour moitié dans le sous-bassin Nord et pour l'autre moitié dans le sous-bassin Sud. L'ensemble de la strate Z2 est considérée dans le sous-bassin Nord

L'étude a été réalisée sur 15 secteurs, appelés strates, définies par l'IFREMER (Sanchez et al. 2013), réparties sur la zone intertidale de répartition de la palourde à l'exclusion des parcs ostréicoles, des chenaux et des zones de prés salés (Figure II.1.). Pour chaque strate, le nombre de stations échantillonnées a été déterminé en fonction de sa surface (approximativement 10 stations

par km<sup>2</sup>) et les échantillons ont été distribués aléatoirement au sein de chaque strate (Sanchez et al. 2013). L'échantillonnage a été réalisé à marée haute à l'aide d'une benne Hamon. Chaque prélèvement de 0,25 m<sup>2</sup> a été tamisé sur trois mailles successives de 20, 10 et 5 mm. Les palourdes récoltées ont ensuite été congelées jusqu'à analyse.

Pour la campagne 2012, les deux autres espèces de palourdes présentes sur le bassin d'Arcachon : la palourde européenne *Venerupis decussata* et la palourde jaune *Polititapes* (= *Paphia*) *aureus* ont également été récoltées et analysées.

### 2.3 Prévalence et intensité de la BMD

Après décongélation, la prévalence et l'intensité de la BMD ont été déterminées sur les palourdes japonaises, mais également sur les palourdes européennes et les palourdes jaunes pour la campagne 2012.

La prévalence d'une strate est définie comme le % d'individus présentant la maladie.

*NB : les individus de taille inférieure à 23 mm ont été analysés mais ne sont pas pris en compte dans les calculs de prévalence. La prévalence est donc définie pour l'ensemble des individus de taille supérieure à 23 mm (ou pour les gammes de tailles définies).*

L'intensité est la moyenne des Muscle Print Index (MPI) pour les individus malades. Le MPI est un indice utilisé pour estimer le % du muscle atteint par la maladie (Dang et al. 2008). Il s'appuie sur une échelle de 0 à 4 avec 0 = individus sains, 1 = 0-25% du muscle atteint par la maladie, 2 = 25-50%, 3 = 50-75% et 4 = 75-100%. Si les deux valves présentent un MPI différent, le plus fort indice est alors retenu pour caractériser l'intensité de la maladie.

Les prévalences moyennes à l'échelle du bassin, ou des deux sous-bassins Nord et Sud (Figure II.1), ont été calculées à partir des prévalences de chaque strate et affectées d'un coefficient relatif à la superficie de celles-ci. Le même calcul a été réalisé pour calculer les MPI moyens et les proportions de chacun des 4 stades de la maladie (MPI 1 → 4).

Le nombre absolu d'individus malades (ou effectifs de malades) a été obtenu en multipliant la prévalence par le nombre total d'individus sur la strate. Le nombre total (ou effectif total) a été calculé à partir de la densité mesurée et de la surface de la strate.

### 2.4 Suivi mensuel

Chaque mois d'avril 2011 à décembre 2012, dix quadrats de 0,25 m<sup>2</sup> ont été réalisés sur une zone protégée dite "réserve de pêche" (depuis 2009) du bassin d'Arcachon (44°41'N, 1°04'W). Les

palourdes japonaises ont été récupérées sur un tamis de maille 10 mm de diamètre. Les palourdes ont été mesurées (longueur de la coquille) et des cohortes ont été identifiées par la méthode de Bhattacharya (1967) sur le logiciel FISAT II (version 1.2.2, FAO-ICLARM). Pour chacune des cohortes identifiées, entre 30 et 100 individus (suivant la densité) ont été disséqués. La prévalence et l'intensité de la BMD ont été déterminées pour chacune d'entre elles.

Au mois d'avril 2011 (début du suivi), trois cohortes ont été identifiées : 2008 - 2009 - 2010. L'âge moyen "t" des individus recrutés en 2010 et mesurés en avril 2011 a été estimé suivant l'équation de Von Bertalanffy en considérant les paramètres de croissance définis sur ce site par Dang et al. (2010b) :

$$L_t = L_\infty [1 - e^{-kt}] \text{ avec } k = 0,51 \cdot \text{an}^{-1} \text{ et } L_\infty = 43,6 \text{ mm}$$

$$t = \ln(1 - L_t/L_\infty) / -k$$

L'âge  $t$  calculé a servi de base à toutes nos estimations. En avril 2011, l'âge des individus des cohortes 2009 et 2008 a été estimé à respectivement  $t + 12$  mois et  $t + 24$  mois. En mai 2011 l'âge des individus de la cohorte 2010 a été estimé à  $t + 1$  mois, de la cohorte 2009 à  $t + 13$  mois et de la cohorte 2008 à  $t + 25$  mois. Le même calcul a été effectué chaque mois.

Une corrélation entre les âges estimés par cette méthode et les âges théoriques calculés à partir l'équation de Von Bertalanffy pour toutes les tailles a été réalisée pour tester la validité de cette estimation.

Les calculs de prévalence et d'intensité de la maladie ont été réalisés comme décrit dans le paragraphe 2.3.

### *2.5 Analyses statistiques*

L'ensemble des analyses a été réalisé sur le logiciel STATISTICA 7.1.

Les différences entre deux prévalences ont été testées avec un test du Chi-2. Les proportions des 4 stades de MPI ont été comparées à l'aide d'un test de Chi-2 si  $n > 20$  ou d'un test exact de Fisher si  $n < 20$ .

Une ANOVA a été réalisée pour comparer les MPI entre strates et/ou entre années. La normalité des données a été au préalable admise et l'homoscédasticité testée avec le test de Cochran.

Les corrélations entre les différents paramètres suivis ont été réalisées (corrélation de Spearman).

### 3. Résultats

#### 3.1 Comparaison à l'échelle du bassin

En 2010, 3 620 palourdes japonaises de longueur supérieure à 23 mm ont été analysées et 4 932 en 2012. Les plus petits individus malades détectés mesuraient 26,4 mm en 2010 et 23,3 mm en 2012 et appartenaient tous les deux à la strate B.

La prévalence moyenne à l'échelle du bassin a diminué de 4,96% en 2010 à 2,90% en 2012 ( $p < 0,001$ ). Les intensités moyennes (MPI) sont constantes avec 1,97 en 2010 et 1,95 en 2012 ( $F = 0,001$ ,  $p = 0,97$ ). Pour l'ensemble des individus malades, une dominance significative des stades 1 pour les deux années est observée ( $p < 0,001$ ). En 2010, ceux-ci représentent 49,1% des individus échantillonnés et les trois autres stades, MPI = 2, MPI = 3 et MPI = 4 sont représentés de façon équitable avec 18,7%; 18,1% et 14,1% respectivement ( $p > 0,05$ ). Le même schéma se retrouve en 2012 avec 53,1 % de stade 1 et des proportions équivalentes de stades 2, 3 et 4 avec respectivement 14,3%, 17,2% et 15,4% ( $p > 0,05$ ).

A l'échelle du bassin, une corrélation positive a pu être mise en évidence entre la prévalence de la BMD dans les strates et la longueur moyenne des coquilles (taille) pour 2010 et 2012 (Tableau II.1). En 2010, la longueur moyenne est également corrélée, mais de façon négative, à la densité de palourdes dans la strate. Aucune autre corrélation n'a été établie pour 2010 et 2012 entre la prévalence, le MPI moyen, la densité et la taille moyenne (Tableau II.1).

Tableau II.1. Tableau de corrélation entre les différents paramètres étudiés pour chacune des strates et pour les deux années de suivi. Prévalence = prévalence de la BMD (individus > 23 mm), MPI = MPI moyen, Densité = densité des individus > 23 mm, taille = longueur moyenne de la coquille. R = coefficient de corrélation de Spearman et p = p-value. En gras les corrélations pour lesquelles  $p < 0,05$ .

	Prévalence x Taille	Prévalence x MPI	Prévalence x Densité	Taille x MPI	Taille x Densité	MPI x Densité
2010	<b>R = 0,58</b> <b>p = 0,029</b>	R = - 0,21 <i>p = 0,464</i>	R = - 0,37 <i>p = 0,191</i>	R = - 0,27 <i>p = 0,347</i>	<b>R = - 0,62</b> <b>p = 0,013</b>	R = 0,35 <i>p = 0,217</i>
2012	<b>R = 0,63</b> <b>p = 0,015</b>	R = 0,29 <i>p = 0,300</i>	R = - 0,11 <i>p = 0,714</i>	R = - 0,08 <i>p = 0,780</i>	R = -0,31 <i>p = 0,256</i>	R = 0,22 <i>p = 0,456</i>

#### 3.2 Comparaison à l'échelle des strates

L'analyse réalisée à l'échelle des strates (Figure II.2) montre une tendance générale à la diminution de la prévalence entre les deux années. Cette diminution de prévalence est significative pour la strate C (9,09% → 1,37%.  $p = 0,001$ ), la strate S4 (4,49% → 1,84%.  $p = 0,034$ ), la strate Z2 (3,30% → 0,65%.  $p = 0,028$ ) et la strate Z3 (3,75% → 0%.  $p = 0,003$ ). Une augmentation de la prévalence est

notée pour les strates F (0% → 5,41%) et H (4,76% → 8,89%) mais sans que cela soit significatif (respectivement  $p = 0,120$ ;  $p = 0,156$ ). L'intensité moyenne (MPI) est constante entre les différentes strates en 2010 ( $F = 0,74$ ,  $p = 0,712$ ) et également en 2012 ( $F = 1,59$ ,  $p = 0,093$ ).

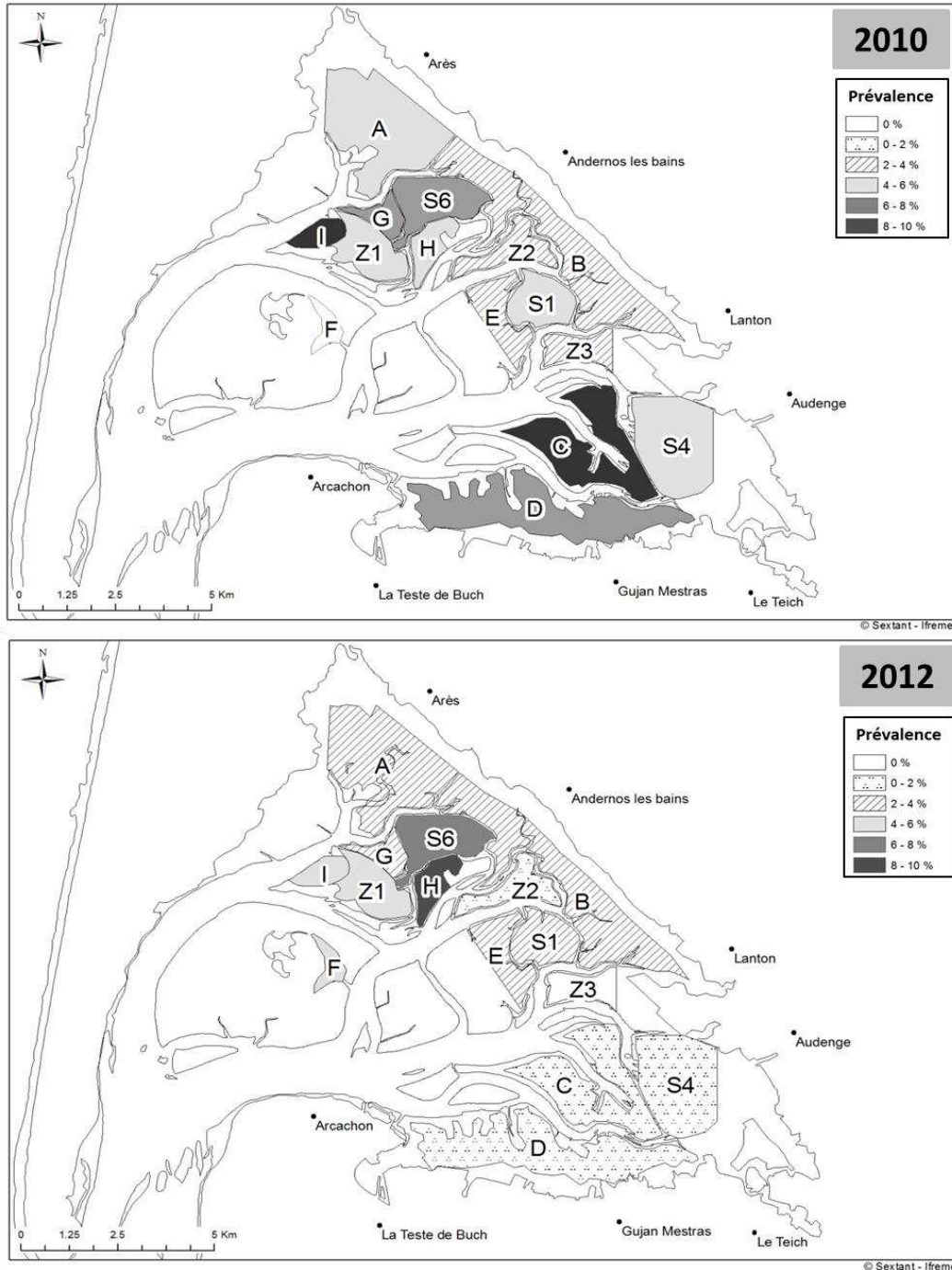


Figure II.2. Comparaison 2010-2012 des prévalences moyennes obtenues pour chacune des strates échantillonnées. Les gammes de prévalence sont définies comme suit : 0% = aucun individus malade; 0 - 2% =  $0\% < \text{prévalence} < 2\%$ ; 2 - 4% =  $2\% \leq \text{prévalence} < 4\%$ ; 4 - 6% =  $4\% \leq \text{prévalence} < 6\%$ ; 6 - 8% =  $6\% \leq \text{prévalence} < 8\%$ ; 8 - 10% =  $8\% \leq \text{prévalence} \leq 10\%$



### 3.3 Comparaison de différentes gammes de tailles

Les prévalences et intensités de la maladie ont été analysées pour différentes gammes de taille (Figure II.3).

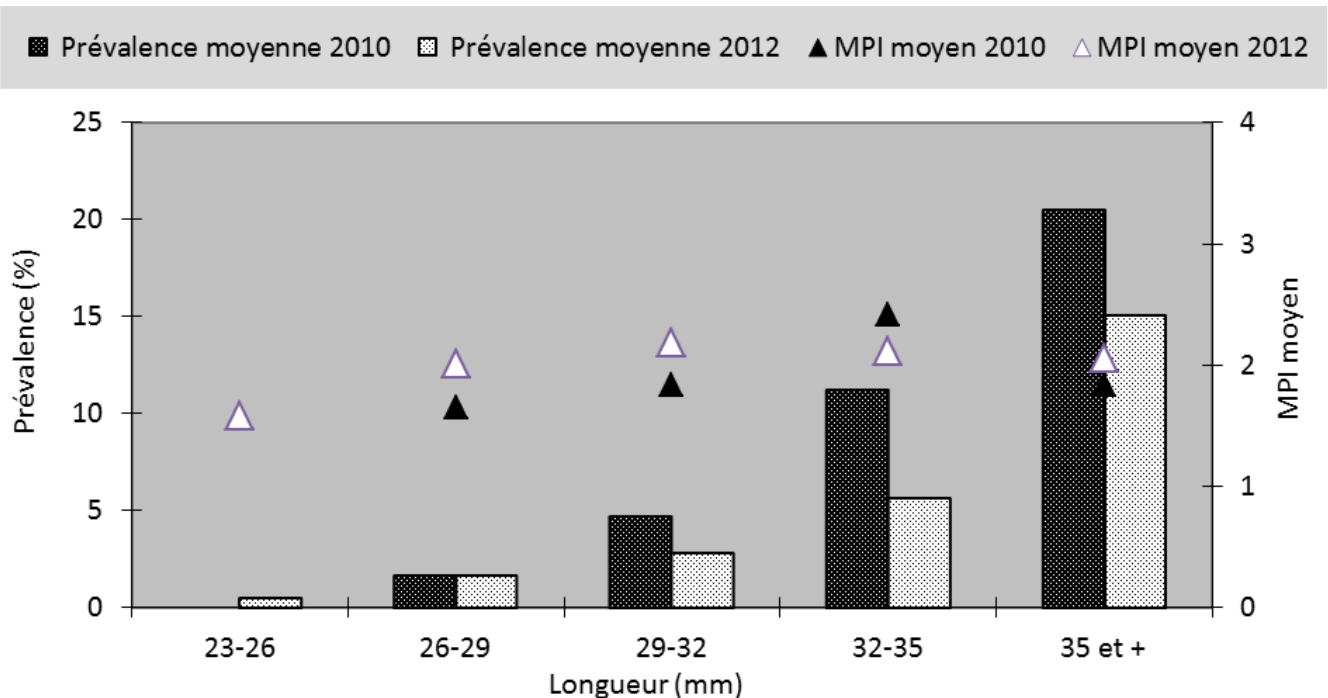


Figure II.3. Evolution de la prévalence moyenne et de l'intensité moyenne (MPI moyen) de la maladie en fonction des gammes de tailles et pour les deux années suivies. Les gammes de taille sont toutes définies comme suit : 23-26 = 23 mm  $\leq$  taille < 26 mm. Les prévalences moyennes sont représentées par des histogrammes noirs (2010) et gris clair (2012) et la valeur moyenne du MPI pour chaque gamme est caractérisée par des triangles noir (2010) et gris clair (2012)

Pour les deux années considérées, la prévalence augmente avec la taille des individus ( $p < 0,001$ ). On note également une diminution de la prévalence entre 2010 et 2012 pour les gammes de tailles 29-32 mm ( $p = 0,018$ ) et 32-35 mm ( $p < 0,001$ ) qui représentent 36% des effectifs en 2010 et 40% en 2012 (pour l'ensemble des individus  $> 23$  mm). L'analyse des valeurs totales de palourdes pour les gammes de tailles montre différents cas d'évolution entre 2010 et 2012 (Tableau II.2). Pour les individus de 23 à 32 mm, les effectifs totaux de palourdes, tout comme les effectifs totaux d'individus malades, ont augmenté. Les plus fortes augmentations sont notées pour les individus de 26-29 mm et 29-32 mm avec respectivement +69 et +63%. Pour les individus de 32 à 35 mm, l'effectif total a augmenté (+ 19%) alors que l'effectif de malades a diminué. Pour la fraction exploitable ( $> 35$  mm) les deux paramètres ont diminué. L'effectif total a baissé d'environ 20% et le nombre total de malades a été réduit de moitié. L'intensité de la maladie (MPI) reste relativement

constante entre les différentes gammes de tailles et ce pour les deux années suivies. Elle s'échelonne de 1,65 à 2,41 pour l'année 2010 et de 1,58 à 2,18 pour l'année 2012.

Tableau II.2. Nombres totaux d'individus et de malades présents sur le bassin pour chaque gamme de taille et pour les deux années de suivi. Ces nombres totaux sont calculés pour chaque strate à partir de la densité de la strate et de sa surface puis additionnés pour obtenir une valeur totale à l'échelle du bassin. Le nombre total d'individus regroupe les individus sains (MPI = 0) ainsi que les individus malades (MPI = 1,2,3 et 4). Les gammes de taille sont toutes définies comme suit : 23-26 =  $23 \text{ mm} \leq \text{taille} < 26 \text{ mm}$ . Le total comprend l'ensemble des individus de taille  $\geq 23 \text{ mm}$

		23 – 26 mm	26- 29 mm	29 – 32 mm	32 – 35 mm	35 mm et +	TOTAL
Nb total d'individus ( $\times 10^3$ )	2010	208 559	200 830	179 706	106 499	53 576	<b>749 170</b>
	2012	257 963	338 283	285 391	126 583	44 136	<b>1 052 356</b>
Nb total de malades ( $\times 10^3$ )	2010	0	3 297	9 752	9 920	10 793	<b>33 762</b>
	2012	1 763	6 047	10 497	7 749	5 291	<b>31 347</b>

La Figure II.4 regroupe les proportions de chaque MPI mesurées pour les deux années et pour les différentes gammes de taille. Pour la majorité des gammes de tailles, le stade 1 est le plus représenté. On note toutefois en 2010, une proportion équivalente des 4 stades pour les palourdes de 32 à 35 mm, et une prédominance des stades 1 et 2 pour les 35 mm et +. Pour 2012, le stade 4 est minoritaire comparé aux trois autres stades pour les individus de 29 à 32 mm.

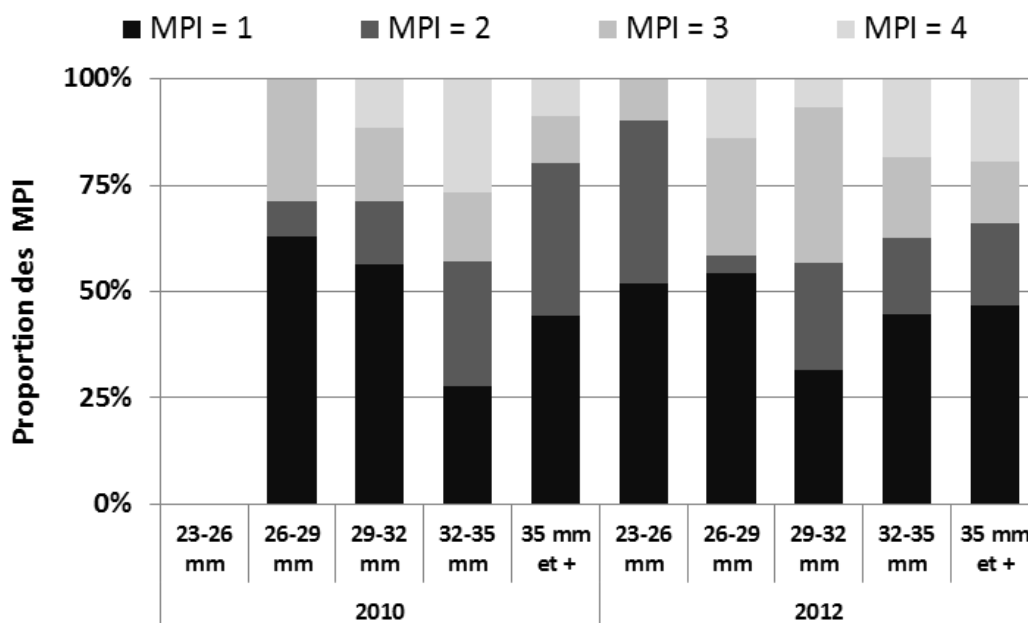


Figure II.4. Proportion des 4 stades de la maladie (MPI 1 → 4) pour les différentes gammes de tailles considérées et les deux années suivies. Les gammes de taille sont toutes définies comme suit : 23-26 =  $23 \text{ mm} \leq \text{taille} < 26 \text{ mm}$

Pour la première gamme de taille où la maladie est détectée, 26-29 mm en 2010 et 23-26 mm en 2012, aucun individu de stade 4 n'a été observé.

### 3.4 Comparaison des deux sous-bassins

La comparaison des deux sous-bassins Nord et Sud (voir Figure II.1) présente des résultats différents en 2010 et en 2012. En 2010, la prévalence moyenne est de 4,6% pour le sous-bassin Nord et elle est équivalente ( $p = 0,308$ ) dans le sous-bassin Sud avec 5,3%. Pour l'année 2012, le sous-bassin Nord présente une prévalence moyenne deux fois plus élevée que le sous-bassin Sud ( $p < 0,001$ ) avec 4,2 % contre 1,9%. Pour les deux années de suivi, les effectifs entre sous-bassins sont équivalents.

La comparaison temporelle de chacun des sous-bassins montre une prévalence qui reste constante entre les deux années pour le sous-bassin Nord (4,6%  $\rightarrow$  4,2%.  $p = 0,475$ ). Pour le sous-bassin Sud cependant, la prévalence a chuté de presque 2/3 entre 2010 et 2012 (5,3%  $\rightarrow$  1,9%.  $p < 0,001$ ).

Les prévalences de la BMD pour les gammes de tailles précédemment utilisées à l'échelle du bassin entier ont été également comparées à l'échelle des sous-bassins. Les résultats sont regroupés dans le tableau II.3.

Tableau II.3. Prévalences moyennes de chacun des deux sous-bassins pour les deux années de suivi et les gammes de tailles considérées. Les gammes de taille sont toutes définies comme suit : 23-26 = 23 mm  $\leq$  taille < 26 mm. Pour chaque gamme de tailles, les prévalences entre années et entre sous-bassins ont été comparées. Les lettres indiquent des niveaux de prévalence significativement différents au sein d'une même gamme de taille

		23-26 mm	26-29 mm	29-32 mm	32-35 mm	35 mm et +
Prévalence 2010	Sous-bassin <b>Nord</b>	0% <sup>a</sup>	1,9% <sup>a,b</sup>	3,6% <sup>a</sup>	10,3% <sup>a</sup>	14,8% <sup>a</sup>
	Sous-bassin <b>Sud</b>	0% <sup>a</sup>	1,5% <sup>a,b</sup>	5,5% <sup>a</sup>	12,0% <sup>a</sup>	25,2% <sup>b</sup>
Prévalence 2012	Sous-bassin <b>Nord</b>	0,7% <sup>a</sup>	2,7% <sup>a</sup>	4,2% <sup>a</sup>	7,8% <sup>a</sup>	13,9% <sup>a,b</sup>
	Sous-bassin <b>Sud</b>	0,3% <sup>a</sup>	0,9% <sup>b</sup>	1,7% <sup>b</sup>	3,9% <sup>b</sup>	16,2% <sup>a,b</sup>

En 2010, les prévalences sont équivalentes entre les différentes gammes de tailles considérées sauf pour les individus > 35 mm chez qui la prévalence était plus importante dans le sous-bassin Sud ( $p =$

0,037) mais qui, il est vrai, ne représente que 7% de l'effectif analysé (Tableau II.1). En 2012, trois gammes de tailles (71% de l'effectif mesuré (Tableau II.1) pour les individus > 23 mm) présentent des prévalences moyennes plus faibles dans le sous-bassin Sud que dans le sous-bassin Nord : les individus de 26-29 mm ( $p = 0,002$ ); ceux de 26-32 mm ( $p = 0,003$ ) et les individus de 32-35 mm ( $p = 0,045$ ). Contrairement à 2010, en 2012 les individus > 35 mm présentent une prévalence moyenne équivalente entre les deux sous-bassins ( $p = 0,730$ ).

Dans le sous-bassin Nord, les effectifs ont augmentés entre 2010 et 2012 pour l'ensemble des gammes de tailles. Cette augmentation s'accompagne également d'une augmentation du nombre d'individus malades sauf pour la gamme de taille > 35 mm pour laquelle une baisse du nombre total d'individus malades est notée sans que cela n'affecte significativement la prévalence. Pour le sous-bassin Sud, pour toutes les gammes de taille de 23 à 35 mm, l'effectif total augmente alors que le nombre total d'individus malades diminue entre 2010 et 2012. Pour les individus de taille supérieure à 35 mm, la diminution du nombre d'individus malades s'accompagne également d'une forte baisse des effectifs totaux.

Concernant l'intensité de la maladie (MPI) entre les deux sous-bassins, celle-ci est conforme aux résultats obtenus à l'échelle du bassin entier. On retrouve dans les deux sous-bassins et pour les deux années une prédominance des stades 1, et les stades 2,3 et 4 sont équitablement représentés. Certaines caractéristiques sont toutefois à noter. Pour l'année 2012, le sous-bassin Sud présente une proportion de stade 1 plus grande que le sous-bassin Nord ( $p = 0,016$ ) alors que ce dernier comporte une proportion d'individus de stade 4 ( $p = 0,002$ ) plus grande que dans le sous-bassin Sud. La comparaison annuelle montre que la proportion des stades 1 a augmenté en 2012 dans le sous-bassin Sud, tout comme celle des stades 4 dans le sous-bassin Nord.

### 3.5 Analyse des palourdes *V. decussata* et *P. aureus*

Lors de la campagne 2012, 67 palourdes jaunes de 11,7 à 28,4 mm ont été récoltées. La taille moyenne était de 20,2 mm avec 11 individus de taille supérieure à 23 mm.

Pour les palourdes européennes, 115 individus de 14,2 à 43,7 mm ont été récoltés dont 87 avaient une taille supérieure à 23 mm (taille moyenne 27,5 mm). Pour l'ensemble de ces individus, aucun signe de la BMD n'a été détecté.

## 3.1.6 Suivi de cohorte

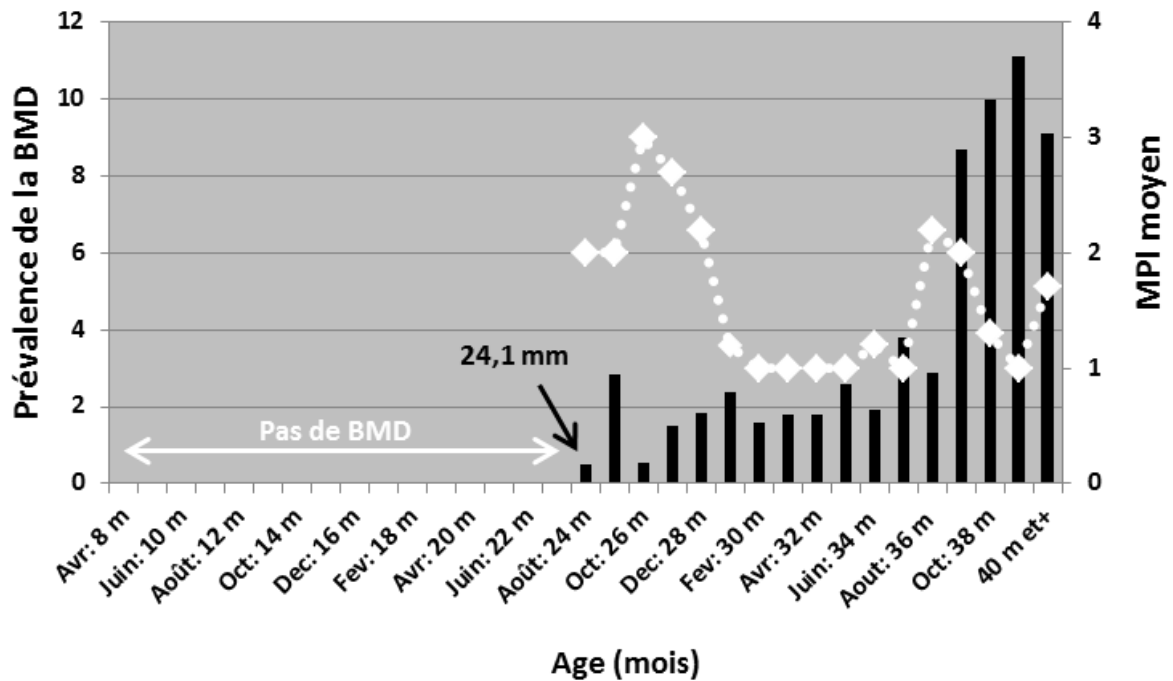


Figure II.5. Evolution de la prévalence (barres noires) et de l'intensité de la BMD (losanges blancs) en fonction de l'âge d'une cohorte moyenne. La légende de l'axe des abscisses est défini comme suit : mois: âge (m = mois) – MPI = Muscle Print Index

La corrélation de Pearson réalisée entre l'âge estimé (Cf matériels et méthodes 2.4) et l'âge théorique calculé par l'équation de Von Bertalanffy pour une taille donnée permet de valider la méthode d'estimation avec un coefficient de corrélation significatif de 0,89 (droite d'origine 0;  $p < 0,001$ ).

Le premier individu malade, détecté au mois d'août 2012, mesure 24,1 mm pour un âge approximatif de 24 mois. La prévalence de la BMD s'échelonne de 0,5 à 11% et est corrélée à l'âge des individus ( $R = 0,8$ ;  $p < 0,001$ ) (Figure II.5). L'intensité moyenne (MPI) est comprise entre 1 et 3. Aucune corrélation n'a été établie entre la prévalence et le MPI moyen ( $R = -0,23$ ;  $p = 0,36$ ) ni entre l'âge et le MPI moyen ( $R = -0,37$ ;  $p = 0,14$ ). Sur l'ensemble des individus malades analysés lors du suivi de cohorte (soit 50 individus tous âges confondus), la majorité présente un MPI de 1 (66%.  $p < 0,001$ ). Les stades 2, 3 et 4 sont équitablement représentés avec respectivement 12%, 16% et 6% ( $p = 0,11$ ).

## 4. Discussion

### 4.1 Evolution de la BMD et des effectifs de palourde

Depuis sa première description en 2005 (Dang et al. 2008), la BMD est toujours présente sur le bassin d'Arcachon.

Les résultats des cartographies réalisées en 2010 et 2012 semblent néanmoins démontrer une tendance à la diminution de la prévalence. Bien que la prévalence totale à l'échelle du bassin (individus > 23 mm) n'excède pas les 3% en 2012, les prévalences rencontrées sur la fraction exploitable du stock (individus de longueur > 35 mm), de l'ordre de 15%, restent préoccupantes pour l'activité de pêche.

Une chute de la prévalence peut résulter de deux paramètres : une diminution du nombre absolu d'individus malades et/ou une augmentation du nombre d'individus sains. A l'échelle du bassin, la diminution de la prévalence résulte de ces deux paramètres : une augmentation des effectifs totaux (recrutement) et une diminution du nombre absolu d'individu malades (mortalité).

L'analyse plus fine réalisée à l'échelle des sous-bassins Nord et Sud montre toutefois une évolution différente entre ces deux zones. Pour le sous-bassin Nord, les prévalences restent constantes pour l'ensemble des gammes de tailles étudiées avec une augmentation simultanée (et compensée) du nombre d'individus sains et du nombre d'individus malades (sauf pour les individus de taille > 35 mm où le nombre absolu de malades n'augmente pas sans que cela affecte la prévalence).

La baisse de prévalence observée à l'échelle du bassin résulte des changements observés uniquement au niveau du sous-bassin Sud. Dans ce dernier, on note également une augmentation des effectifs pour l'ensemble des individus de 23 à 35 mm mais qui s'accompagne cette fois d'une diminution du nombre absolu d'individus malades, entraînant ainsi les baisses de prévalence observées. Pour les individus de la fraction exploitable (> 35 mm), la prévalence reste constante entre les deux années, mais en 2012 les effectifs totaux ainsi que le nombre absolu de malades chutent fortement. Cette double baisse pourrait s'expliquer par la mort des individus infectés.

*NB : l'activité de pêche pourrait également être mise en cause dans cette double diminution. Toutefois, la BMD entraîne une remontée des individus à la surface du sédiment. Les collaborations et rencontres avec les pêcheurs arcachonnais montrent que ces derniers ne prélèvent pas préférentiellement les palourdes de surface, et auraient même tendance à ne pas les prélever du fait de leurs coquilles verdâtres peu commercialisables. L'hypothèse d'une disparition des individus malades imputable à des mortalités BMD-dépendante est plus probable qu'une hypothèse de disparition liée à la pêche.*

Deux hypothèses peuvent expliquer la baisse de prévalence observée chez les individus du sous-bassin Sud âgés d'environ 2 à 3 ans (29-35 mm). La baisse du nombre absolu d'individus malades implique soit une baisse réel du nombre d'individus infestés durant cette période soit que les individus infestés ne sont déjà plus visibles. Le premier cas suggère une infection limitée par l'agent responsable de la BMD qui peut être le fait d'une diminution de la quantité de particules infectieuses présentes dans le milieu, et/ou de conditions environnementales défavorables à l'agent infectieux et/ou favorables à une résistance des palourdes. Dans le second cas de figure, la diminution du nombre total d'individus infestés serait le fait d'une mortalité BMD-dépendante importante de ces individus.

Les effectifs totaux ont fortement augmentés entre 2010 et 2012 (individus > 23 mm). Toutefois l'augmentation a été plus faible dans le sous-bassin Sud avec seulement + 30% contre + 54% d'augmentation dans le sous-bassin Nord. Cette augmentation plus faible favoriserait l'hypothèse d'une mortalité BMD-dépendante faisant diminuer la prévalence comme c'est le cas pour de nombreuses maladies affectant les bivalves marins (Kennedy 1984, Anderson & Gordon 1982, Desclaux et al. 2004, Dang & de Montaudouin 2009).

D'autre part, les mollusques bivalves sont considérés par de nombreux auteurs comme des réservoirs pour les agents viraux (Revue de Meyers 1984). On peut donc penser qu'à la mort de l'individu hôte, les particules virales sont relarguées dans le milieu environnant, comme c'est le cas par exemple pour *Perkinsus* spp. (Bushek et al. 2002, Ragone-Calvo et al. 2003) et peuvent ainsi aller infecter d'autres hôtes. Dans le sous-bassin Sud, la disparition des individus malades de taille supérieure à 35 mm laisserait ainsi penser à un apport important de particules virales durant ces dernières années. Cette hypothèse va à l'encontre d'une infection limitée dans la zone par le nombre de particules infectieuses présentes et favorise l'idée d'une mortalité BMD-dépendante entraînant la baisse de la prévalence. Cette hypothèse peut toutefois être nuancée par le turn-over de la masse d'eau important présent dans le sous-bassin Sud et évoqué dans le chapitre précédent. Malgré un apport important en particules infectieuses, le renouvellement important des masses d'eau dans cette zone pourrait limiter leur probabilité de rencontre avec un nouvel hôte.

#### 4.2 Dynamique du système BMD/palourde

Chez les mollusques bivalves, des corrélations positives entre taille/âge de l'hôte et intensité et/ou prévalence parasitaire ont déjà été observés chez divers systèmes hôtes/parasites : *C. edule*/trématodes digènes (de Montaudouin et al. 2000), *V. philippinarum*/*Perkinsus* spp. (Park et

al. 1999, Park & Choi 2001, Dang et al. 2010a), *V. decussata/Perkinsus* spp. (Villalba et al. 2005), *V. philippinarum/Vibrio tapetis* (Flye-Sainte-Marie et al. 2008) où les agents infectieux se retrouvent libres dans l'eau de mer.

Chez les bivalves filtreurs, cette corrélation positive peut s'expliquer d'une part par une augmentation avec l'âge et donc avec la taille de la probabilité d'une rencontre avec le parasite, et d'autre part par des capacités de filtration plus importantes que chez les jeunes individus (Guralnick et al. 2004, Villalba et al. 2005). Cependant, de Montaudouin et al. (2012) ont montré qu'il pouvait également exister des "tailles vulnérables" modifiant légèrement ce schéma.

Aucune corrélation entre l'intensité de la maladie et la taille/âge des individus ou la prévalence n'a été observée. La prédominance des stades 1 et les proportions plus faibles et équivalentes des stades 2,3 et 4 suggèrent une première phase de la maladie relativement longue où l'hôte conserve une activité relativement normale. L'absence d'individus au stade 4 pour les premières gammes de tailles étudiées confirme une évolution relativement lente de la maladie. Au-delà du stade 2, les fonctions physiologiques sont trop touchées. La maladie progresse plus rapidement et entraîne la mort. La BMD peut donc entraîner la mort d'individus dès 26 mm.

#### 4.3 Spécificité de la BMD

L'absence de traces de la BMD sur les palourdes européennes et les palourdes jaunes de taille supérieure à la taille minimale d'infestation observée chez la palourde japonaise confirment la spécificité d'hôte déjà évoquée par Dang et al. (2008).

Une résistance différente entre *V. philippinarum* et *V. decussata* a été décrite pour d'autres maladies. La palourde japonaise est souvent considérée comme plus résistante aux stress physiologiques et aux pathogènes que la palourde européenne (FAO 2005, Tanguy et al. 2008). Les suivis de la perkinsose montrent notamment une plus forte prévalence et intensité chez *V. decussata* que chez *V. philippinarum* (Villalba et al. 2004, Arzul et al. 2009) et il en est de même pour les trématodes digènes en Espagne (Navas et al. 1992, Dang et al. 2009a).

A l'inverse, l'agent *Vibrio tapetis*, responsable de la maladie de l'anneau brun, influence plus *V. philippinarum* que *V. decussata* et d'autres espèces endémiques (Maes & Paillard 1992, Paillard et al. 1997, Allam et al. 2001)

Lorsque une espèce hôte et un parasite sont originaires de deux zones distinctes, ils n'ont pas co-évolués ensemble et cette particularité peut rendre l'organisme hôte particulièrement vulnérable vis-à-vis du parasite (Combes 1995). C'est ainsi que *Perkinsus* sp., introduit en France en même



temps que la palourde japonaise (Hine 2001) a un impact plus important sur l'espèce endémique *V. decussata* avec laquelle il n'a pas co-évolué. Il en est de même pour *Vibrio tapetis*, décrit pour la première fois en France et qui semble également plus virulent pour l'espèce introduite *V. philippinarum* que pour les espèces endémiques.

L'impact plus important de l'agent étiologique de la BMD sur l'espèce introduite *V. philippinarum* suggère une origine endémique de cet agent.

En conclusion, la prévalence totale de la BMD chez les palourdes japonaises susceptibles de contracter la maladie (taille > 23 mm) a diminué de 42% entre 2010 et 2012. Cette diminution touche toutes les classes de longueur > 29 mm et est indépendante de l'effectif et d'un éventuel changement de structure globale de population. On peut donc penser que la diminution de la prévalence n'est pas le seul fait d'une disparition des individus les plus atteints (baisse de l'effectif) ni de l'arrivée d'individus sains, mais qu'une série d'autres mécanismes sont également mis en jeu. A une échelle plus petite (sous-bassin, strate), l'évolution de la prévalence est plus complexe à analyser. Il semble que la tendance à la baisse notée précédemment sur l'ensemble du bassin est le bilan d'un sous bassin nord qui voit la BMD stagner à un niveau assez élevé par rapport à un bassin sud où elle aurait chuté. Les mécanismes qui régissent la dispersion de la BMD divergeraient entre les deux sous-bassins considérés.

La diminution de la prévalence à l'échelle du bassin représente un résultat encourageant pour l'avenir du stock mais qu'il convient cependant de fortement nuancer. En se concentrant sur la taille exploitable (> 35 mm), on remarque que l'effectif total a diminué de  $\approx 9,5 \cdot 10^6$  individus soit environ 120 t, la moitié d'entre eux sans doute du fait de la BMD ( $\approx 5 \cdot 10^6$  malades ont disparus en 2 ans). De plus, des individus de plus en plus petits sont atteints par la maladie: la taille minimale était de 26,4 mm en 2010 et est passée à 23,3 mm en 2012. Ceci implique un risque accru de mortalité à des stades de plus en plus petits et donc une probabilité plus faible pour ces individus d'atteindre un jour la taille légale de pêche.

---

## Chapitre III

# BMD : impact sur la biologie de la palourde japonaise *Venerupis (=Ruditapes)* *philippinarum*

---

*Texte intégral de la publication*

*Binias C, Gonzalez P, Provost M, Lambert C, de Montaudouin X. Brown Muscle Disease: impact on Manila clam Venerupis (=Ruditapes) philippinarum biology. Fish & Shellfish Immunology, under review*

**Abstract**

This study assessed the effect of Brown Muscle Disease (BMD) on Manila clam *Venerupis philippinarum* fitness. BMD was recently discovered (2005). It affects the posterior adductor muscle and leads initially to clam gaping and eventually death. Three statuses of clams were compared: buried individuals with no signs of BMD (BUR); clams at the surface of the sediment with no signs of BMD (SURF) and clams at the surface of the sediment exhibiting signs of brown muscle disease (BMD). Physiological (condition index), immune (hemocyte parameters) and molecular (gene expressions) parameters collected seasonally were analyzed and compared.

Results demonstrated a seasonal pattern in condition index (CI) with peaks in spring/summer and decreases in autumn/winter. At each season, the highest CI was observed in BUR and the lowest CI was observed in BMD.

In terms of immune response, phagocytosis rate and capacity were higher in clams with BMD whereas the health status of the clams did not influence the total hemocyte count. Genes involved in the immune system (*comp*, *tnf*, *inter*) were upregulated in clams with BMD. The molecular analysis of gill and posterior muscle showed higher mitochondrial metabolism (*cox-1*, 16S) in cells of infected clams, suggesting a stronger energetic demand by these cells. Finally, genes involved in oxidative stress response (*cat*, *sod*), detoxification (*mt*) and DNA repair (*gadd45*) were also overexpressed due to reactive oxygen species production.

Most of the studied parameters underlined a cause-effect correlation between Manila clam health status (BUR, SUR, BMD) and physiological parameters. An important stress response was observed in BMD-infected clams at different scales, *i.e.* condition index, immune parameters and stress-related gene expression.

## 1. Introduction

Capture fisheries and aquaculture supplied the world with about 148 million tons (Mt) of product in 2010 with a total value of 217.5 US\$ billions (FAO 2012). Freshwater and marine bivalves represented 14.4 Mt of this production, with strong domination by Ostreidae and Veneridae. However, the emergence of infectious diseases represents a limiting factor for aquaculture and fisheries and has led to serious economic losses (Carnegie 2005). There are several examples throughout the world where the development and spread of infectious diseases acted as a precursor to production collapse. In most cases, protozoans, bacteria and virus pathogens were involved. Concerning oysters, the “winter mortality” that occurred in oyster *Saccostrea glomerata* in 1924 (Australia) was perhaps the earliest epizootic of bivalves associated with a parasitic etiological agent, the protozoan *Bonamia roughleyi* (Roughley 1926). From then on, many other host/parasite interactions associated with massive mortalities have been identified, e.g. *S. glomerata/Marteilia sydneyi* (QX disease) in Australia (Wolf 1972, Perkins & Wolf 1976), *Ostrea edulis/Bonamia ostreae* and *Marteilia refringens* in Europe (Grizel et al. 1988), *Crassostrea angulata*/irido-like virus in France (Gouilletquer & Heral 1997), *Crassostrea gigas*/herpes-like virus around the world (Renault & Novoa 2004).

After *Crassostrea* spp., the Manila clam, *Venerupis* (= *Ruditapes*) *philippinarum*, is the most exploited bivalve in the world with 3.24 Mt and 0.65 Mt produced from aquaculture and capture fisheries respectively (FAO 2012). Manila clam stocks also suffer from many diseases, mainly due to bacteria *Vibrio tapetis* (Brown Ring Disease)(Paillard 2004) and protozoans *Perkinsus* spp. In 2005, a new disease named Brown Muscle Disease (BMD) was discovered, in Arcachon Bay (Dang et al. 2008) where the Manila clam fishery is of major importance (Sanchez et al. 2010). BMD was rapidly involved in high mortalities in adult Manila clams in the area (Dang et al. 2008). The disease was present in 62% of the Manila clam habitat surface (Dang & de Montaudouin 2009) with a prevalence reaching in some areas 30% of adult's specimen (Dang et al. 2008). Dang & de Montaudouin (2009) focused on a high prevalence area of Arcachon Bay and showed that 95% of the mortality of the 4-yr old cohort was due to BMD. At the individual scale, condition index of Manila clams affected by BMD was reduced by 37% (Dang & de Montaudouin 2009). The disease affects the posterior adductor muscle which becomes infused with conchiolin and becomes progressively calcified. Diseased clams are often associated with the presence of clams at the surface of sediment, which is an abnormal position for this infaunal bivalve. An analysis of “surfaced

clams” revealed an infection rate three times higher than buried (*i.e.* normal position) sympatric clams (Dang et al. 2008). In laboratory trials, surfaced clams displayed greater mortality rates after 15 days than buried individuals (82% against 12%). Ultrastructural observation by transmission electron microscopy revealed the presence of virus-like particles (Dang et al. 2009b). At sub-lethal level, the effects of BMD on the physiology of clams, *e.g.* its condition index, immune response or interest gene expressions, are unknown and constitute the basis of this study. However, BMD in clams in this area cannot be dissociated from perkinsosis which, in our ecosystem, is very prevalent and co-occurs with BMD (Binias et al. 2013). Perkinsosis was discovered in 1956 by Mackin et al. (1950) in *Crassostrea virginica*, and since then an abundant literature has focused on this disease and its etiological agent, their distributions, hosts and epizootology (Villalba et al. 2004). Recently, *Perkinsus* sp. mean abundance and prevalence in Arcachon bay was assessed at around  $10^5$  cells.g<sup>-1</sup> of gill and 100%, respectively (Lassalle et al. 2007, Dang 2009). At this level of infection, only sub-lethal effects on physiology, reproduction and growth have been observed (Casas 2002 in Villalba et al. 2004). Besides their direct pathological consequences, infection by *Perkinsus* sp. may render hosts more susceptible to other diseases (Ordas et al. 2000, Hégaret et al. 2007, Queiroga et al. 2013).

The use of energetic budgets for defense against pathogens may slow growth and reduce condition of market sized individuals, and may lead to deficiency of energy reserves required for gametogenesis (Villalba et al. 2004). In general terms, infection causes host weakening so that it becomes increasingly difficult for affected individuals to overcome any other adverse conditions (Villalba et al. 2004).

The ability to activate or induce defense reactions in response to microbial challenge, inflammatory conditions or environmental stress is a fundamental property of organisms (Zhou et al. 2001). Bivalves possess natural innate defenses, including an open circulatory system in which hemocytes are the primary effectors of cellular immunity. These cells are able to detect foreign material and induce an efficient immune response (Canesi et al. 2002, Donaghy et al. 2009). The health status of marine bivalves can be inferred from immune parameters, such as hemocyte concentration and phagocytosis (Chu 2000). However, factors other than disease, such as temperature, salinity, nutritional stress or air exposure, can modulate immune reaction (Chu 2000, Thompson et al. 1978, Reid et al. 2003, Park et al. 2012). Consequently, measurement of other parameters, such as condition index or expression modulation of genes involved in defence against pathogens, is essential to assess the influence of infection on the global immune response

(Donaghy et al. 2009). During the last decade, development of transcriptomic approaches has led to the description of the impacts of a number of xenobiotics and parasites on host cell response. However, concerning the bivalves only a few studies have determined the modulation of gene expression patterns during the infection process. Nevertheless, recent analysis revealed that perkinsosis was able to increase the transcription level of genes involved in the oxidative stress defence and apoptotic mechanisms in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Wang et al. 2010d). In the same way, bonamiosis due to the parasite *Bonamia ostreae* has been associated with differential expression of various genes notably those involved in immune response such as cytokines, stress proteins, eicosanoids or genes involved in phagocytosis (Martin-Gomez et al. 2012, Morga et al. 2012). However, for *V. philippinarum* such molecular reports remained scarce. *Perkinsus* sp. was assumed to increase the expression of different sets of lectins (Kang et al. 2006) and a modified-expression of metallothioneins had been observed during exposure to the bacteria *Vibrio tapetis*, the parasite *Himasthla elongata* and cadmium used alone or mixed in controlled conditions (Paul-Pont et al. 2010). The first partial transcriptome analysis by high throughput sequencing of Manila clams has been recently achieved, finally making several gene sequences available (Ghiselli et al. 2012). In this context it appeared particularly relevant to determine the molecular impact of BMD in *V. philippinarum* to contribute to the limited knowledge currently available on the cellular effects of this disease.

Our field observations showed that adult Manila clams in Arcachon Bay may be divided into three "statuses": 1) individuals that are buried in the sediment. Most of them are BMD-free but are already infected by the parasite *Perkinsus* sp.; 2) individuals that are at the surface of the sediment but do not exhibit BMD signs; 3) individuals that are at the surface of the sediment and exhibit BMD signs. Our aim was to compare the adaptive response of bivalves in these three statuses at three organisation biological levels: 1) Physiological with the measurement of condition index; 2) Cellular with evaluation of hemocyte parameters and 3) Molecular with expression of genes that are involved in cellular metabolism. *Perkinsus* sp. abundance was also measured. This correlative approach, including seasonal variations, will provide a better understanding of Manila clams response to the BMD.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling site

Arcachon Bay is a 156 km<sup>2</sup> semi-sheltered lagoon along the Atlantic coast of France (Figure III.1).



Figure III.1. Location of sampling site (white disk)

It is subject to both oceanic and continental influence. The manila clam is, in terms of biomass, the dominant species of intertidal flats (Blanchet et al. 2004). Specimens of *V. philippinarum* were collected from an intertidal site (44°41'N, 1°04'W), with characteristics of which were gathered in Table III.1. From January to December 2012, the sediment temperature was measured every hour using *in situ* electronic devices. Water salinity data were provided by the SOMLIT network (<http://somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/>). Ten 0.25 m<sup>2</sup> were sampled every month to estimate clam density. Sediment grain size (median in  $\mu\text{m}$ ) and % of organic and silt and clay was also measured in this site at one occasion.

Table III.1. Seasonal environmental characteristics of sampling site: temperature (°C), salinity, clam density, sediment grain size (median in  $\mu\text{m}$ ), % of organic matter and % of silt and clay

	Winter	Spring	Summer	Autumn
Temperature (°C)	8.3	16.4	22.3	13.2
Salinity	31.32	31.84	33.81	33.04
Density of <i>V. philippinarum</i> (ind.m <sup>2</sup> )	180	154	158	146
Sediment grain size median ( $\mu\text{m}$ )	-	-	-	98
% of organic matter in sediment	-	-	-	4
Silt and clay (%)	-	-	-	25

### 2.2. Sampling procedure

Manila clams were sampled seasonally in 2012 (Winter/Spring/Summer/Autumn), until 40 individuals of the same shell length (for a given season) and of the three following statuses were obtained: 1) buried (BUR); 2) surfaced and free of signs of BMD (SURF); 3) and surfaced with signs of BMD (BMD). Half of the clams (*i.e.* 20 per status) were selected for immunological analyses, *Perkinsus* sp. abundance estimation and condition index analysis. The second half was used for analysis of gene expression and, again, *Perkinsus* sp. abundance (except in winter because of insufficient sampling). Each surfaced clam was opened with a scalpel and BMD occurrence was estimated by eye. BMD intensity was assessed through the Muscle Print Index (MPI). MPI characterizes the % of the posterior adductor muscle surface colonized by the brown muscle on a scale of 0 to 4 as follows: 0 (healthy = without BMD), 1 (0-25% of the muscle surface is affected), 2 (25-50%), 3 (50-75%) and 4 (75-100%) (Dang et al. 2008).

### 2.3. Immunological analyses

Hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle using a 1 mL syringe fitted with a 25 gauge needle. Only individual samples that were confirmed to be free of contamination (bacteria, phytoplankton, tissus debris...) following observation by microscope were retained for analysis. The hemolymph was filtered on 80  $\mu\text{m}$  mesh and stored on ice to minimize cell clumping. For Total Hemocyte Counts (THC), an aliquot of hemolymph (100  $\mu\text{L}$ ) was diluted by adding 100  $\mu\text{L}$  of filtered sterile seawater and fixed with addition of 200  $\mu\text{L}$  of a formaldehyde solution at 6.4% in seawater. Another 200  $\mu\text{L}$  aliquot of hemolymph was incubated with 40  $\mu\text{L}$  of a solution of latex yellow-green fluorescent beads for phagocytosis analysis (Fluoresbrite TM plain YG-2.0  $\mu\text{m}$  microspheres 2.5% solids-latex. Polysciences, Inc, Warrington, PA 18976). Samples were incubated for 2 hours at 18°C and the phagocytosis was stopped by adding 240 $\mu\text{L}$  of a formaldehyde solution at 6.4% in seawater. All samples were then preserved at 4°C in darkness before flow-cytometry analysis.

Analyses were done within a week using a FACScalibur flow-cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). For THC, 4  $\mu\text{L}$  of a SYBRgreen solution (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA, 1/10 of the DMSO commercial solution) was added to 400  $\mu\text{L}$  of THC sample to mark the DNA of the hemocytes. The SYBR-green fluoresces in green and can be detected by the FL1 detector of the flow-cytometer. Total hemocyte concentrations, in cells per mL, were estimated from the flow rate measurement of the flow cytometer, done according to Marie et al. (1999).



For Phagocytosis, the FL1 detector of the flow cytometer detected hemocytes containing fluorescent beads. The phagocytosis rate was calculated as the percentage of active hemocytes that have ingested three fluorescent beads or more (Delaporte et al. 2003). Phagocytosis capacity was defined as the mean number of beads engulfed in active hemocytes. Data analysis was performed using WinMDI 2.8 software.

#### 2.4. *Perkinsus sp.* abundance and Manila clam condition index

*Perkinsus sp.* abundance was estimated using the protocol from Ray (1952) modified by Choi et al. (1989). Clams were dissected and their gills were excised and weighed. The gill was incubated in 10 mL of fluid thioglycollate medium (FTM) supplemented with antifungal (Nystatin. Final concentration 40 µg.mL<sup>-1</sup>) and antibiotics (Streptomycin and penicillin G. Final concentration 66 µg.mL<sup>-1</sup> and 32 µg.mL<sup>-1</sup> respectively). Gills were incubated for at least one week in the dark at room temperature. After this time, the FTM was discarded following centrifugation (10 min-800xg). Gill tissues were digested twice with 2N NaOH at 60°C for 1 hour. After centrifugation (10 min-800xg), the supernatant was discarded and the pellet washed twice with a sterile solution of Phosphate Buffered Saline and resuspended in 1 mL of the same solution. *Perkinsus sp.* hyphospores were enumerated on a Malassez counting chamber by light microscopy. Their abundance was defined as the number of cells per gram of wet gill tissues of analyzed clams and prevalence as the percentage of infected clams.

Remaining tissues were conserved in order to calculate the condition index:

$$CI = \text{dry flesh weight (mg)} / \text{dry shell weight (g)}$$

Dry flesh weight was calculated by adding remaining tissues and dry weight of gills which was used for *Perkinsus sp.* counts. This dry weight of gills was obtained by multiplying its wet weight by 0.153 (Flye-Sainte-Marie 2008).

#### 2.5. Gene analyses

For all the sampled seasons, except winter due to insufficient number of clams, and each of the three statuses (buried, surfaced free of BMD and surfaced with BMD), 20 clams were analyzed for *Perkinsus sp.* (as previously described). Five clams of each status were selected in order to obtain 15 clams with similar *Perkinsus sp.* intensity.

Forty mg of fresh tissues of three organs, *i.e.* posterior adductor muscle, visceral mass and remaining gill, were excised and conserved in RNA later at -80°C until analyses. Total RNAs were

extracted using the absolutely RNA Miniprep kit (Agilent technologies) and reverse transcribed with the Affinity Script Multi Temperature cDNA synthesis kit (Agilent technologies), according to the manufacturer's instructions. Real time PCR reactions were performed on Lightcycler (Roche). The amplification program consisted of one cycle at 95°C for 10 min and 50 amplification cycles at 95°C-5s, 60°C-5s, 72°C-20s.

Each reaction contained 17 µL of master mix including the SYBRgreen I fluorescent dye (Roche) enabling the monitoring of the PCR amplification, 2 µL of the gene specific primer pair (final concentration 300 nM for each primer) and 1 µL of cDNA. Primers pairs used are listed in Table III.2.

Table III.2. Nucleotide sequences of specific primer pairs used. a) Upstream primer - b) forward primer

GENE	FUNCTION	ACCESSION NUMBER (reference) / <i>Ruphibase</i> number	SEQUENCE 5'-3' a) Upstream primer b) forward primer
β-actin ( <i>act</i> )	Housekeeping gene	EF520696 (Paul-Pont 2010)	a)CGCACTTCCTCACGCCATCAT b)CATTTCCTGTTCAAAGTCCAAG
Catalase ( <i>cat</i> )	Oxidative stress response	EF520699 (Paul-Pont 2010)	a)CTGATGGCTACAGACAGATC b)GTTGCCTGGGCGATG
Cytochrome oxidase 1 ( <i>cox-1</i> )	Mitochondrial metabolism	HQ703309 (Chen et al. 2011)	a)GTACCCCTCCGTTGTCGTC b)CCTGTTACTCCTAAACACCAAG
Mitochondrial Super Oxide Dismutase ( <i>sod</i> )	Oxidative stress response	JQ362416 (Umasuthan et al. 2012)	a)GATAATGTTGATCATGCTGGACC b)GTCTACATCAGCGTGAACGACAA
ARNr 16S ( <i>16S</i> )	Mitochondrial metabolism	AB065375 (Okazaki & Ueshima. Unpublished)	a)AGAAGACCCTGTCCGAG b)TTACGGCTGTTATCCCT
Metallothionein ( <i>mt</i> )	Detoxification	AJ249686 (Moraga & Tanguy. Unpublished)	a)GCAAGTGTCCGACCAATG b)CGAGCAGTCGTTGCCA
Growth Arrest and DNA Damages( <i>gadd45</i> )	DNA repair	<i>ruditapes2_c424</i>	a)ATGTCAGGGCATGAGTGC b)CCTCAATCAGCTTGTGTTGG
BCL2-associated X protein ( <i>bax</i> )	Regulation of apoptosis	<i>Ruditapes-c25303</i>	a)GCACCTTGGATTATAGAGAGAGGC b)AGTTTTAAGGATGACATCATTGGTCAC
Cytochrome P450 ( <i>cytp450</i> )	Metabolism of xenobiotics	HQ234335 (Zhang et al. Unpublished)	a)CTCCGAATTTCTCACGT b)CTTACGGGTCCTTCCAACA
Glutathione-S-Transferase ( <i>gst</i> )	Metabolism of xenobiotics	HM061130 (Zhang et al. Unpublished)	a)TGTGAAGAGAACGCCTTG b)GACGTCCATCATTGGGAATC
Complement component c3 ( <i>comp</i> )	Immune response	<i>ruditapes_c29809</i>	a)ATGAGGGCATTAACTGAAGTCAC b)ACCCATAGCGGGGTACA
Tumor-Necrosis-Factor receptor- associated factor 6 ( <i>tnf</i> )	Immune response	<i>ruditapes_c28561</i>	a)CATGTGCGAAATGCGCAA b)TCATGCTATAGGCTGGATGGT
Interferon-alpha beta receptor alpha chain ( <i>inter</i> )	Immune response	<i>ruditapes2_lrc5244</i>	a)TGGTTCTGTTGCCGT b)TTACAAGGACATCTCCCGTCA

Existing primers in GenBank were used (Accession number) and new primer pairs were designed from the RuphiBase (the Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) transcriptome database) using the Lightcycler probe design software (version 1.0 Roche).

Relative quantification of each gene expression level was normalized according to housekeeping gene expression, the  $\beta$ -actin. Indeed, among the normalizing genes tested  $\beta$ -actin was assumed to be the most relevant under our conditions. Relative gene expression was generated using the  $2^{-\Delta CT}$  method as described by Livak and Schmittgen (2001) where  $\Delta CT$  represents the difference between the cycle threshold of a specific gene and the cycle threshold of the  $\beta$ -actin. Inductor factor (IF) of each gene was determined in comparison with control (= buried clams = normal position) corresponding to the following equation:

$$IF = 2^{-\Delta CT \text{ (unburied with or without BMD)}} / 2^{-\Delta CT \text{ (buried)}}$$

The same equation was used to determine IF of unburied clams with BMD compared to unburied clams without BMD.

### *2.6. Statistical analyses*

The effect of seasons and/or "status" was tested using a crossed two-ways ANOVA.

Prior to analysis, normality was assumed and homogeneity of variance was verified (Cochran Test).

Data were  $\log(X+1)$  transformed when necessary. A posteriori test of Tukey was used to compare means. When homoscedasticity was not achieved, non-parametric tests were used (Kruskal-Wallis).

Expression level of genes ( $2^{-\Delta C_T}$ ) was compared between three conditions using a ANOVA. Prior to analysis, normality was assumed and homogeneity of variance was verified (Cochran Test). Induction factor (IF) was calculated only for significant difference.

Analyses were performed using Statistica 7.1 software.

### 3. Results

#### 3.1. Physiological and cellular parameters

##### 3.1.1 Shell-length

The mean shell length of sampled clams ranged between 32 and 34 mm. Von Bertalanffy growth function ( $K = 0.5075 \text{ yr}^{-1}$  and  $L_{\infty} = 43.55 \text{ mm}$ ) established in this site in a previous study (Dang et al. 2010b), suggested that the age of these clams was between 32 and 36 months, respectively. Sampled clams displayed different shell lengths among seasons ( $p < 0.001$ ) within a range of 32 (spring) to 34.1 mm (autumn). However, at each season, shell length among statuses was similar ( $p=0.60$ ) (Table III.3. Figure III.2.I). Diseased clams used for condition index, total hemocyte count and phagocytosis analyses showed the same intensity of BMD ( $n = 60$ ;  $p = 0.35$ ), *i.e.* a similar Muscle Print Index (MPI. mean  $\pm$  SE) ranged between  $1.8 \pm 0.8$  (winter) and  $2.3 \pm 1.1$  (autumn).

Table III.3. Results of multifactorial ANOVA comparing the effect of season and/or status on physiological and cellular parameters. *df* = degree of freedom, *F* = Mean square between groups/ mean square within group

		Multifactorial ANOVA		
		df	F	<i>p</i> -value
Length (mm)	Season	3	13.04	< 0.001
	Status	2	0.51	0.602
	Season x status	6	0.47	0.826
Condition index	Season	3	24.23	< 0.001
	Status	2	127.41	< 0.001
	Season x status	6	4.31	< 0.001
<i>Perkinsus</i> abundance (cell.g <sup>-1</sup> of gills)	Season	3	1.14	0.33
	Status	2	9.17	< 0.001
	Season x status	6	0.81	0.56
Total Hemocytes Count (cell.mL <sup>-1</sup> )	Season	3	19.85	< 0.001
	Status	2	2.15	0.118
	Season x status	6	5.75	< 0.001
Phagocytosis rate (%)	Season	3	90.32	< 0.001
	Status	2	10.98	< 0.001
	Season x status	6	13.21	< 0.001
Phagocytosis capacity	Season	3	83.64	< 0.001
	Status	2	26.45	< 0.001
	Season x status	6	20.53	< 0.001

##### 3.1.2 Condition index (CI)

The CI showed a seasonal pattern ( $p < 0.001$ ) and also varied among statuses ( $p < 0.001$ ). CI was higher in spring-summer (32.2 and 36.8 respectively) than in autumn (27.1) and winter (23.1) ( $p < 0.001$ ) (Table III.3. Figure III.2.II).

Concerning status, highest CI was measured in buried clams (39.9 average for four seasons). Among surfaced clams, BMD-infected individuals were characterized by the lowest CI values ( $CI_{BMD-free} = 29.1$ ,  $CI_{BMD} = 21.4$ ) (Figure III.2.II).

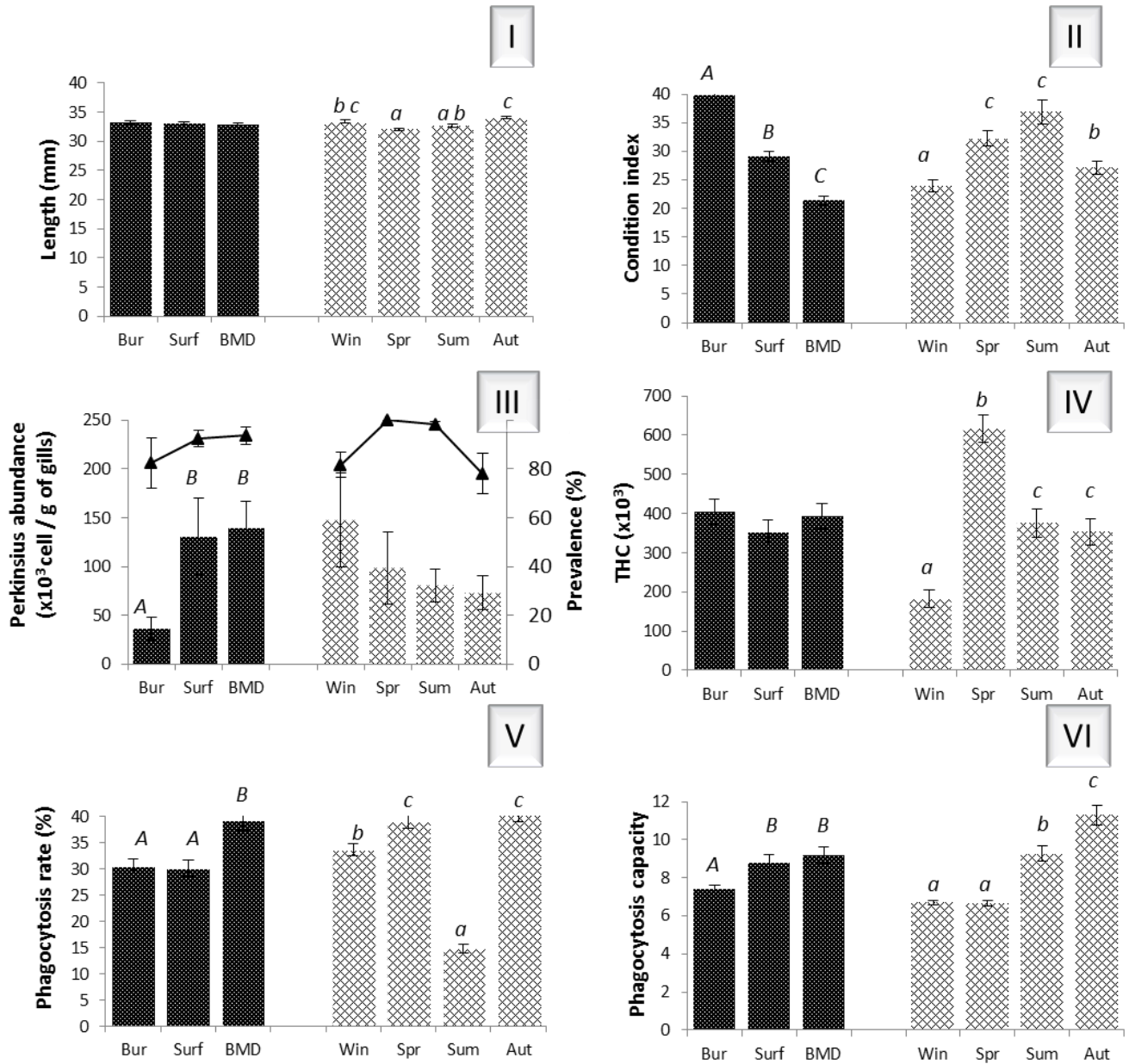


Figure III.2. Results of post-hoc analysis of multifactorial ANOVA (Mean; Standard error). Lettering indicates the significant difference between three statuses (upper case) or four seasons (lower case) for shell length (mm), condition index, Perkinsus sp. abundance ( $\times 10^3$  cells.g<sup>-1</sup> of gills. Histogramm) and Perkinsus prevalence (%. Dark line), Total Hemocytes Count (THC  $\times 10^3$ ), phagocytosis rate (%) and phagocytosis capacity. Bur = buried clams; Surf = surfaced clam BMD-free; BMD = surfaced individuals with BMD signs. Win = winter; Spr = spring; Sum = summer; Aut = autumn

### 3.1.3 *Perkinsus sp. abundance and prevalence*

No seasonal pattern of *Perkinsus sp.* abundance in Manila clams was observed ( $p = 0.33$ ) (Table III.3). Prevalence was always high (80 to 100% according to season (Figure III.2.III)). *Perkinsus sp.* abundance in surfaced clams, with or without BMD signs was 4 times higher ( $p < 0.001$ ) than *Perkinsus sp.* abundance in buried clams (approximately 135,000 cells.g<sup>-1</sup> of gills vs. 36,000) (Figure III.2.III). Prevalence was in average 83%, 93% and 94% for buried, surfaced and BMD clams, respectively. Globally, a negative correlation was noted between *Perkinsus sp.* abundance and IC, ( $r^2 = - 0.15$ ;  $p = 0.027$ ).

### 3.1.4 *Hemocyte parameters*

Position in or on the sediment (buried vs. surfaced) did not influence total hemocyte counts (THC) ( $p = 0.12$ ). Conversely, there were clear seasonal fluctuations. A peak of the THC was observed in spring (600,000 cell.mL<sup>-1</sup>) while values were lower in winter (182,000 cell.mL<sup>-1</sup>). Spring and autumn presented intermediate values (Figure III.2.IV).

Phagocytosis rate and phagocytosis capacity did not follow the same pattern. Only clams with BMD signs presented a high phagocytosis rate ( $p < 0.001$ ). Concerning phagocytosis capacity, the position at the surface of the sediment (with or without BMD) seemed to stimulate phagocytosis ( $p < 0.001$ ). Phagocytosis rate was the highest in spring and autumn (38-40%) and the lowest in summer (15%) (Figure III.2.V). Autumn was also characterized by a high level of phagocytosis capacity (11.3), while low levels were measured in winter and spring (6.7) (Figure III.2.VI).

## 3.2. *Molecular parameter: gene expression*

Among the three selected organs, only the posterior muscle and the gill presented significant difference in the expression of the studied genes. Significant observations of inhibition (IF < 1) or induction (IF > 1) were gathered in Table III.4 for the posterior muscle and in Table III.5 for the gill. Induction factors were calculated with  $2^{-\Delta CT (SURF \text{ OR } BMD)} / 2^{-\Delta CT (BUR)}$ . Nevertheless, a significant difference between surfaced clams ( $2^{-\Delta CT (BMD)} / 2^{-\Delta CT (SURF)}$ ) is observed (Tables III.4 and III.5).

The shell length of the clams was more important in autumn (33.8 mm) than during both other seasons (31 mm,  $p < 0.001$ ). However, for each seasons, the size was equal among 3 statuses ( $p = 0.55$ ). Diseased clams used for genetic analyses showed the same MPI ( $n = 15$ ;  $p = 0.43$ ) ranged between (mean  $\pm$  SE) 1.5  $\pm$  0.6 (spring) and 2.2  $\pm$  1.3 (autumn) and infection level by *Perkinsus sp.* was rather low (30,000 cell.g<sup>-1</sup> of gills).

All 12 studied genes presented a difference of expression for each of the three monitored seasons. The strongest levels were observed in autumn and in summer. Spring always exhibited the lowest level of expression.

### 3.2.1 Posterior muscle

In spring, an up-regulation of *mt* and immune responses related genes was observed. In summer, only *comp* associated with immune response was induced as well as *cox-1* and 16S for mitochondrial metabolism. For both seasons, a significant impact of BMD on genes was observed: BMD clams were different from BMD-free buried and surfaced clams for *mt* or *tnf*, and to a lesser extent for *cox-1* and *inter*.

The most important differences were observed in autumn. Indeed, the position according to the sediment appeared as a key- factor. Surfaced clams, with or without BMD, exhibited the same pattern (except for *mt* and *gadd45*). A strong overexpression of genes involved in mitochondrial metabolism, immune response and oxidative stress response, was evidenced.

Table III.4. Relative expression (compared to  $\beta$ -actin expression) of selected genes in posterior muscle. -: no significant difference compared with buried clams (BUR); <1: significant inhibition; >1 significant induction; \*: gene expression in BMD is significantly different compared with SURF

		SPRING		SUMMER		AUTUMN	
		SURF	BMD	SURF	BMD	SURF	BMD
<i>cat</i>	Oxidative stress response	-	-	-	-	15	15
<i>sod</i>		-	-	-	-	14	37
<i>cox-1</i>	Mitochondrial metabolism	-	-	-	10	80	92
16S		-	-	-	8*	196	232
<i>mt</i>	Detoxification	-	2*	-	-	-	12*
<i>gadd45</i>	DNA repair	-	-	-	-	-	5
<i>bax</i>	Regulation of apoptosis	-	-	-	-	-	-
<i>cyt p450</i>	Metabolism of xenobiotics	-	-	-	-	-	-
<i>gst</i>		-	-	-	-	-	-
<i>comp</i>		-	5	-	11*	90	183
<i>tnf</i>	Immune response	-	2*	-	-	21	28
<i>inter</i>		-	10	-	-	-	-

### 3.2.2 Gill

In the gill, clams impacted by BMD exhibited few differential expression patterns in spring and autumn compared to buried individuals. Light induction or repression of *cat*, *sod*, *cox-1* and *mt* were determined for these two seasons, along with an increase of the *inter* gene (x 36) observed in spring. During the same seasons, BMD-free clams from the surface showed quite similar expressions profiles to those of buried clams. Only the 16S and *tnf* genes increased 2 fold in spring, and a small repression (x 0.3) of *cat* was reported in autumn.

In contrast, during summer, all studied cellular functions were induced in diseased clams. A high induction of genes related to the immune system, detoxification and DNA repair was observed. Genes involved in regulation of apoptosis (*bax*) and of metabolism of xenobiotics (*cyt p450*, *gst*) were also expressed in this organ and this season.

Table III.5. Relative expression (compared to  $\beta$ -actin expression) of selected genes in gill. -: no significant difference with buried clams; <1: significant inhibition; >1 significant induction; \*: gene expression in BMD is significantly different compared with SURF

		SPRING		SUMMER		AUTUMN	
		SURF	BMD	SURF	BMD	SURF	BMD
<i>cat</i>	Oxidative stress response	-	7	-	-	0.3	0.3
<i>sod</i>		-	0.5*	-	5*	-	-
<i>cox-1</i>	Mitochondrial metabolism	-	3	-	8*	-	0.2
16S		2	-	-	8*	-	-
<i>mt</i>	Detoxification	-	2	-	19*	-	5*
<i>gadd45</i>	DNA repair	-	-	-	20*	-	-
<i>bax</i>	Regulation of apoptosis	-	-	-	6*	-	-
<i>cyt p450</i>	Metabolism of xenobiotics	-	-	-	8*	-	-
<i>gst</i>		-	-	-	2*	-	-
<i>comp</i>	Immune response	-	-	-	40*	-	-
<i>tnf</i>		2	-	-	68*	-	-
<i>inter</i>		-	36	-	-	-	-



## 4. Discussion

### 4.1. Condition index

In environmental studies, the measurement of condition index (CI) is used to evaluate general condition of bivalves (Lucas & Beninger 1985). The seasonal CI pattern observed in our study is consistent with observations of Marin et al. (2003), Soudant et al. (2004) and Matozzo et al. (2012) with a peak in spring/summer and a progressive decrease from autumn to winter. CI is influenced by biotic and abiotic factors including sexual maturity and food availability: higher CI in spring/summer corresponds to the end of gametogenesis and the high phytoplanktonic availability, whereas the lower CI were recorded in autumn and winter, in the post-spawning phase of clams. Both of the diseases studied here seemed to influence the CI of clams. The surface status associated with a high *Perkinsus* sp. abundance was correlated with a poor CI which was even lower when clams were BMD-infected. Conflicting results have been reported about the effect of perkinsosis on CI. In oysters infected by *Perkinsus marinus*, Gauthier et al. (1990), Crosby & Roberts (1990) and Paynter & Burreson (1991) reported a negative correlation between *Perkinsus* sp. intensity and CI, whereas Chu & La Peyre (1993) and Chu et al. (1993) did not observe a similar result.

In a previous study with *Venerupis philippinarum*, a negative correlation was also noted by Park et al. (1999) whereas Hégaret et al. (2007) did not observe a *Perkinsus* sp. negative impact on CI. In Arcachon Bay, Dang (2009) showed that effect of perkinsosis on CI was moderate or null, depending on the parasite intensity and environmental conditions. The high inter-individual variability of *Perkinsus* sp. abundance (high standard error) can explain these contrasting results and the low  $r^2$  measured in this study.

### 4.2. Impact on immune system

The physiology and health status of marine bivalves can be inferred from immune parameters (Donaghy et al. 2009). Hemocytes are circulating cells considered as cellular immune effectors in marine bivalves and phagocytosis as the primary line of cellular defense (Feng 1988). However, hemocytes are involved in various physiological processes, including tissue repair, shell production and nutrition (Canesi et al. 2002), and several studies showed that environmental factors, such as temperature, salinity, nutrient and toxicants affected these cells (Chu 2000, Reid et al. 2003, Paillard et al. 2004, Matozzo et al. 2012, Park et al. 2012) and could explain the high variability observed.

In this study, Total Hemocyte Count (THC) and phagocytosis parameters showed a contrasting seasonal pattern. Soudant et al. (2004) observed the same seasonal pattern for THC and Flye-Sainte-Marie et al. (2009) showed a decrease of THC and phagocytic capacity associated with low temperature. Unlike THC, phagocytosis presented different values for each of the three investigated statuses. The phagocytic capacity was higher in BMD-infected clams, but seemed mitigated when *Perkinsus* sp. abundance reached higher values. This result contrasts with previous studies showing no significant effect of *Perkinsus* sp. on Manila clam hemocyte parameters (Hégaret et al. 2007) or negative impact with heavy infection tended to decrease phagocytic capacity (Ordas et al. 2000, Flye-Sainte-Marie et al. 2009). However, abalone (*Haliotis discus discus*) exhibited higher phagocytosis rates when challenged with virus (De Zoysa et al. 2011)

The lack of significant difference of THC among statuses can be explain either by 1) the very high inter-individual variation that may hide potential effects (Donaghy et al. 2009), or 2) a potential migration of hemocytes from hemolymph to damaged tissues of diseased clams (Pipe & Coles 1995). This latter hypothesis was supported by the presence of granulocytoma (massive infiltration of hemocytes in tissues) which was previously observed in infected clams (Dang et al. 2008).

Impact of BMD on immune parameters was also highlighted through the increased expression level of genes that are involved in immune system. Surface BMD-free clams presented intermediate values between uninfected buried clams and BMD-infected clams.

#### 4.3. Energetic metabolism

Impacts of viruses on metabolic activity of marine molluscs are relatively unknown. Viruses depend on the metabolic machinery of living cells to complete their « life » cycle (Villareal 2004). Capacities to interfere with the normal metabolic functions of the host cell in order to maximize the efficiency of their replication and to overcome the host cell defense mechanisms was observed in humans (Huang et al. 2012), mice (Silva da Costa et al. 2012), plants (Carmo et al. 2013) and shrimps (Galvan-Alvarez et al. 2012). Energy mobilised for immune response and lesion repair in clams infected by the bacteria *Vibrio tapetis* involved in Brown Ring Disease increase their mitochondrial metabolism (Flye-Sainte-Marie et al. 2007).

Increase of *cox-1* and 16S observed on BMD-infected clam gills and posterior muscle suggest a stimulated mitochondrial activity and an increasing energy demand in the cell. Viruses manipulate the host cell's metabolic network to support viral replication and proliferation. Moreover, immune-stimulation observed in this study can also increase the energy demand in the cell.

The intensive activity of the respiratory chain generates an excess of Reactive Oxygen Species (ROS). Production of ROS is also considered as a defence mechanism involved in the immune response against invading pathogens (De Zoysa et al. 2011). Hemocytes are able to produce ROS (Hégaret et al. 2007, Delaporte et al. 2003) and several studies showed a ROS induction stimulated by viruses (Peterhans et al. 1987, Ano et al. 2010, Tung et al, 2011). These species create oxidative damage on biological macromolecules, *i.e.* DNA, lipids, proteins, which can considerably disturb the cell machinery. Molluscs defense systems against ROS include anti-oxidant enzymes such as superoxide dismutase (expressed by *sod*), catalase (expressed by *cat*) (Pipe et al. 1994, Soldatov et al. 2007) and metallothionein (expressed by *mt*) - the genes induced in this study during BMD challenge. The same induction was observed in scallops infected by acute necrotic virus (Xing et al. 2008) and on abalone during marine bacteria or virus challenges (De Zoysa et al. 2011). Induction of genes involved in DNA repair or apoptosis showed the impact of ROS on cell machinery in spite of antioxidant defense system.

In the case of virus infected cells, the induction of apoptosis (*i.e.* genetically preprogrammed cell death) would severely limit virus production and reduce or eliminate spread of progeny virus in the host (Teodoro & Branton 1997). Thus, most viruses have evolved strategies to limit apoptosis (Teodoro & Branton 1997, Miller & White 1998). Induction of apoptosis by a virus conflicts with its "biological interest". Gene involved in apoptosis, *bax*, were induced only in gills during the summer along with *gst* and *cyt p450*. The presence of xenobiotics, demonstrated by induction of both genes, could explain the apoptotic mechanisms. Thus, Lundgren et al. (2007) showed no induction by virus of *cyt p* genes that would support the presence of xenobiotics in the environment at this time (REPAR 2012).

## 5. Conclusion

The main objective of our study was to assess the impact of BMD on clam physiology, immunology and genetic. Figure III.3 gathers parameters, in arbitrary units, in order to compare the three studied statuses: BUR (buried individuals with no signs of brown muscle disease); SURF (clams at the surface of the sediment with no signs of brown muscle disease) and BMD (clams at the surface of the sediment exhibiting signs of brown muscle disease). The condition index indicated a decrease of the health status from buried clams to individuals presenting BMD signs with an intermediate level of surface BMD-free clams. Most of the studied parameters showed an important stress response against BMD with an intermediate stress level of surface BMD-free clams.

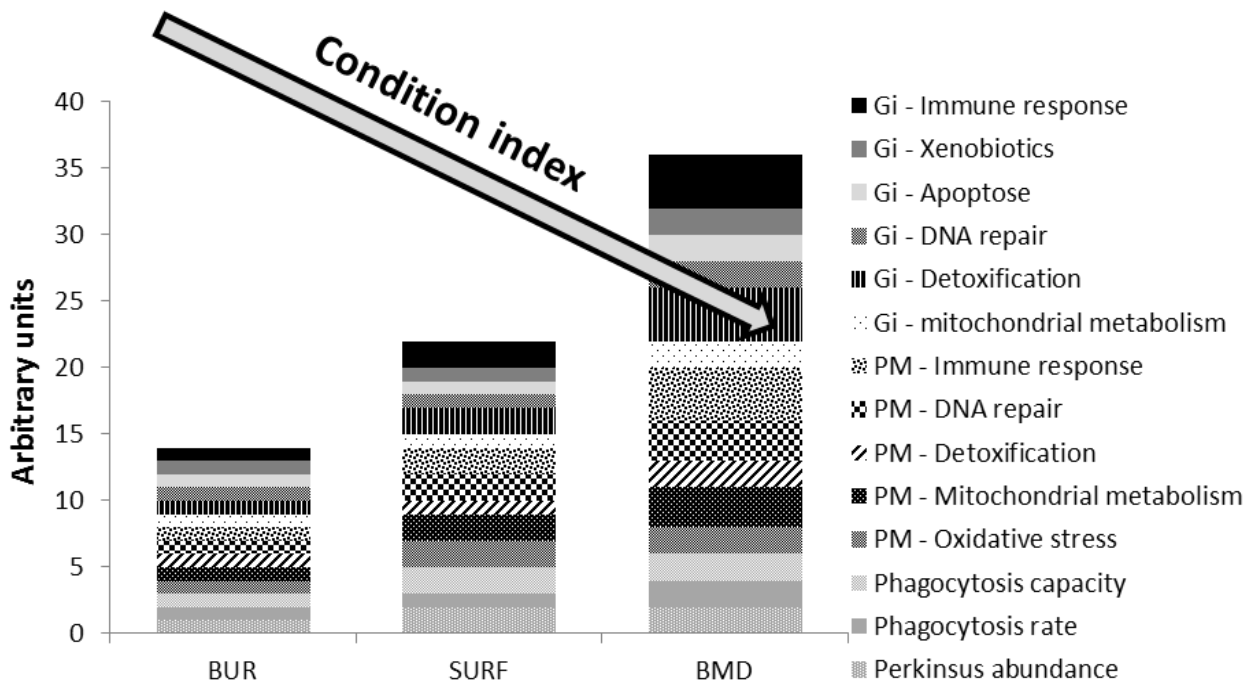


Figure III.3. Expression level of studied parameters, in arbitrary units, for the three studied statuses. Gi = genetic expression in gills; PM = genetic expression in posterior muscle. Only parameters that presented a significant difference among the three statuses (BUR: BMD-free buried clams; SURF: BMD-free surfaced clams; BMD: BMD infected surfaced clams) are represented with basal expression = 1, significant induction = 2 and significant repression = 0

Some bacteria and viruses infecting adult molluscs are considered as secondary invaders or stress parasites rather than primary pathogens (Lauckner 1983, Fryer & Lannan 1994). They are often seen in molluscs that are suffering already from another disease or from environmental stress

(Renault & Novoa 2004, Schikorski et al. 2011b). The presence of exacerbating factors is supported by the high seasonal variability and tissue specificity observed.

Two hypotheses could explain the “health gradient” from buried BMD-uninfected clams to surfaced BMD-infected clams. Firstly, environmental parameters such as xenobiotics induced migration at the surface of the sediment, where clams become more sensitive to infection by *Perkinsus* sp. and/or maybe to BMD, and induce a primary stress response. Secondly, surfaced BMD-free individuals present an earlier stage of this disease, without BMD macroscopic signs, which primarily affects the host physiology, immunology and genetic expression.

A lower prevalence of BMD was always observed in buried clams compared to surfaced clams (Dang et al. 2008). However, analyses on biology of buried clams infected by BMD allow us to evaluate the more relevant hypothesis.

---

# **PARTIE 2**

## **Agent étiologique de la BMD**

---



---

# Chapitre IV

## Identification de l'agent étiologique de la BMD

·  
Microscopie électronique à transmission <sup>(1)</sup>

·  
Purification sur gradient de sucrose <sup>(2)</sup>

·  
Essais de clonage <sup>(2)</sup>

---

*Collaborations :*

*(1) Nathalie Mesmer-Dudons. Unité Ecotoxicologie Aquatique – UMR 5805 EPOC Université Bordeaux 1/CNRS  
Plateforme BIC – Bordeaux Imaging Center*

*(2) Emilie Merour et Michel Brémont. Unité de recherche Virologie et Immunologie Moléculaires – INRA Jouy-en-Josas  
Plateforme GPL-MIMA2 – INRA Jouy-en-Josas*



Le chapitre IV constitue un avant-propos de cette seconde partie consacrée à l'agent étiologique de la BMD. L'objectif était d'obtenir une quantité de particules virales purifiées suffisante pour identifier et caractériser leur génome. Ces particules (VLPs pour Virus-Like Particles) avaient été observées pour la première fois dans le muscle adducteur postérieur des palourdes malades (Dang et al. 2009b).

La **première étape** de ce travail a consisté à observer deux autres tissus de palourdes malades, le manteau et le pied. L'objectif était d'une part de déterminer si les caractéristiques microscopique (désorganisation tissulaire, nécrose des tissus) observées dans le muscle étaient également visibles sur ces tissus mais surtout de révéler ou non la présence de VLPs. En effet, cela permettrait d'avoir potentiellement accès à une plus grande quantité de matériel biologique (pas seulement du muscle adducteur postérieur) à partir duquel extraire ces particules virales.

L'extraction/purification des VLPs constitue le **second objectif** de ce travail et a été réalisée sur gradient de sucrose (= saccharose). Cette méthode est couramment utilisée pour la purification de particules de type viral, chez les mammifères (Giessauf et al. 2002), les oiseaux (Guo et al. 2009) mais également chez les mollusques bivalves comme l'ormeau (Tan et al. 2008) ou la mye commune (AboElkhair et al. 2012). Trois séries de purification ont été réalisées pour affiner le protocole et obtenir un stock important de particules purifiées.

La **troisième partie** de ce travail a consisté en l'utilisation de ces particules virales purifiées pour identifier le matériel génomique présent dans les particules. La nature de l'acide nucléique, ADN ou ARN, renseignerait sur la famille virale concernée. Quant à la connaissance du génome dans son ensemble, celle-ci permettrait d'une part d'appréhender le fonctionnement et le mode d'action du virus (connaissance des protéines impliquées), et d'autre part de pouvoir déterminer à partir de la séquence du génome une méthode de détection rapide de l'agent par sonde PCR, méthode qui serait de plus non invasive pour les palourdes.

## 1. Microscopie optique et microscopie électronique sur manteau et pied

### 1.1 Matériels et méthodes

Une centaine de palourdes japonaises ont été récoltées à la surface du sédiment sur un site interne du bassin d'Arcachon (44°41'N, 1°06'W). Après ouverture et analyse macroscopique, cinq palourdes de longueur de coquille comprise entre 33 et 37 mm et présentant un MPI de 3 (Muscle Print Index, Cf introduction générale) ont été sélectionnées. Cinq individus enfouis dans le sédiment et ne présentant aucun signe de la BMD (palourdes saines) ont également été analysés. Le manteau et le pied ont été prélevés et fixés à 4°C pendant 12 h dans un tampon glutaraldéhyde (Electron Microscopie Science, Hatfield → EMS) avec 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> de sodium cacodylate (EMS) et de l'eau de mer synthétique. Chaque échantillon a ensuite été rincé dans un tampon cacodylate (0,1 mmol.L<sup>-1</sup>) avec du NaCl (2%), fixé pendant 2 h dans 1% de tétraxide d'osmium (OsO<sub>4</sub>. EMS), déshydraté dans un gradient de 50 à 100% d'éthanol puis inclus dans de l'araldite. Le bloc d'araldite a ensuite été coupé au microtome (Reichert Jung OmU3) en sections de 1,5 µm pour l'analyse en microscopie optique ou en sections ultrafines de 400 à 600 Å pour la microscopie électronique à transmission (MET). Les échantillons de microscopie optique ont ensuite été colorés au bleu azur (EMS) puis observés (Microscope optique Leitz). Les échantillons destinés à la MET ont été déposés sur grille de cuivre (150 à 200 mèches) avant observation (Microscope Philips Tecnai 12. Plateforme BIC-Bordeaux Imaging Center).

### 1.2 Résultats – conclusions

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux observés par Dang et al. (2008, 2009b) sur les muscles adducteurs postérieurs. A l'échelle tissulaire, dans le manteau et le pied des individus malades des zones où les tissus semblent désorganisés et nécrosés ont été observées (Figure IV.1 et IV.2) comme c'était le cas pour le muscle adducteur (Dang et al. 2008). Pour les forts grossissements (Figure IV.3), une forte infiltration hémocytaire au niveau des tissus a été observée. De nombreuses granulations, basophiles au vue de leur coloration (violette/noire), suggèrent des cellules immunitaires de type granulocytes et mastocytes. Ce type de cellules est typique d'une réaction inflammatoire.

Les tissus des palourdes saines ne présentent aucun signe de désorganisation ou de réaction inflammatoire (Figure IV.1 et IV.2)

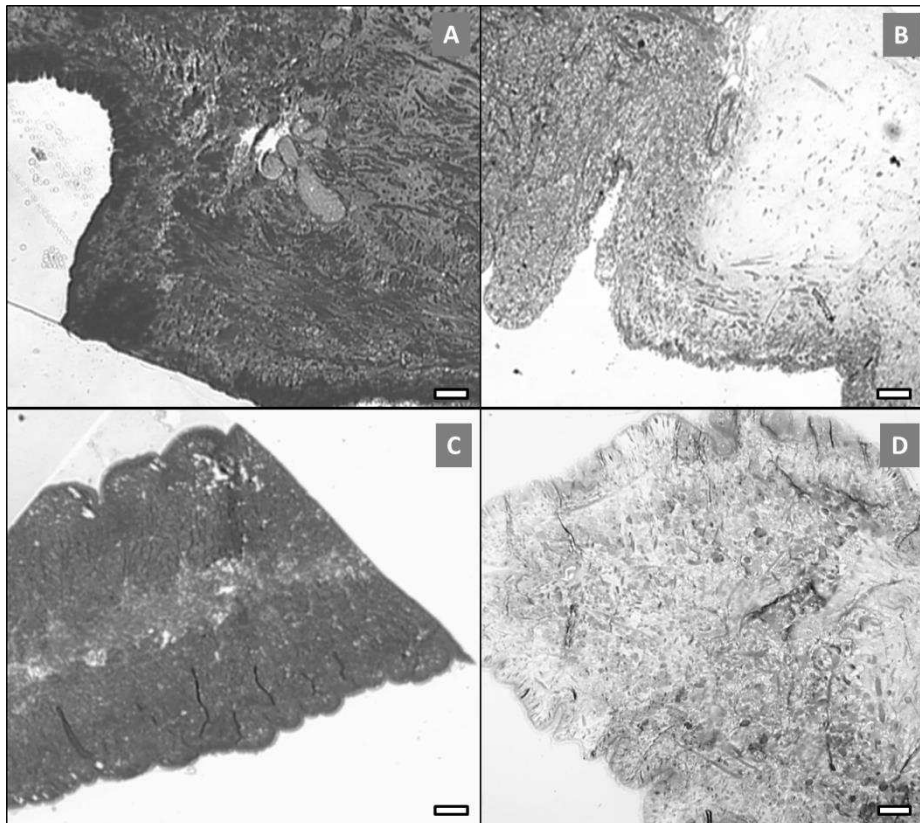


Figure IV.1. Coupes histologiques de manteau de palourde saine (A) et de palourde atteinte de la BMD (B) et de pied d'individu sain (C) et d'individu atteint de la BMD (D). Coloration au bleu azur. Barre d'échelle = 200  $\mu$ m

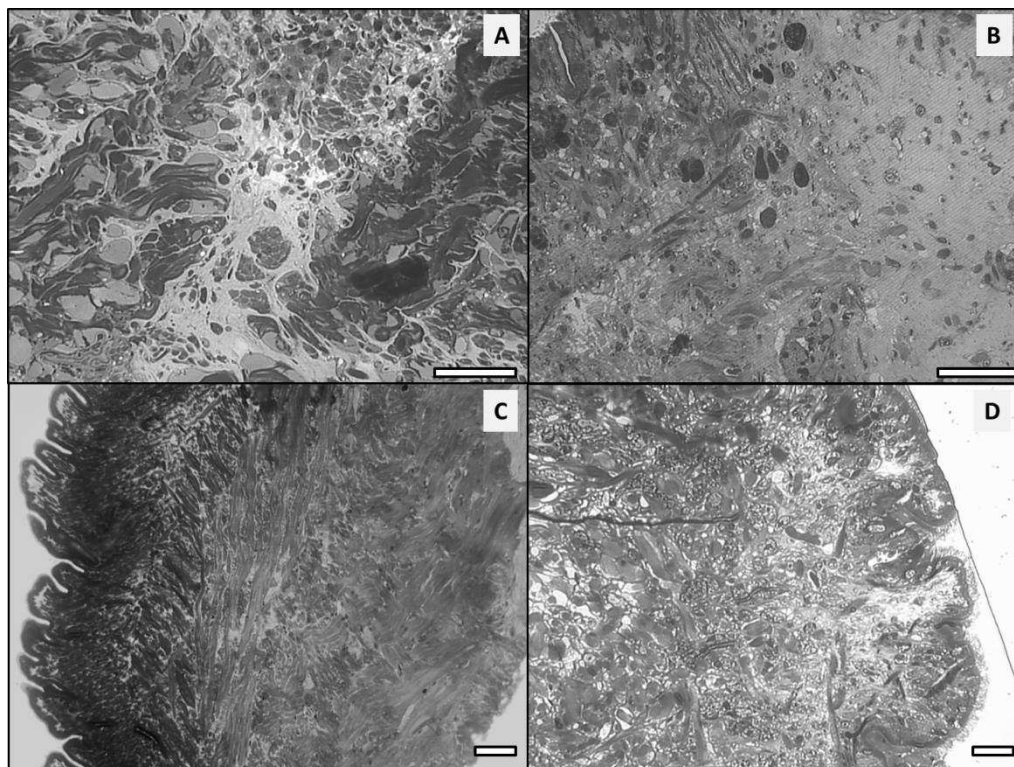


Figure IV.2. Coupes histologique de manteau de palourde saine (A) et de palourde atteinte de la BMD (B) et de pied d'individu sain (C) et d'individu atteint de la BMD (D). Coloration au bleu azur. Barre d'échelle = 100  $\mu$ m

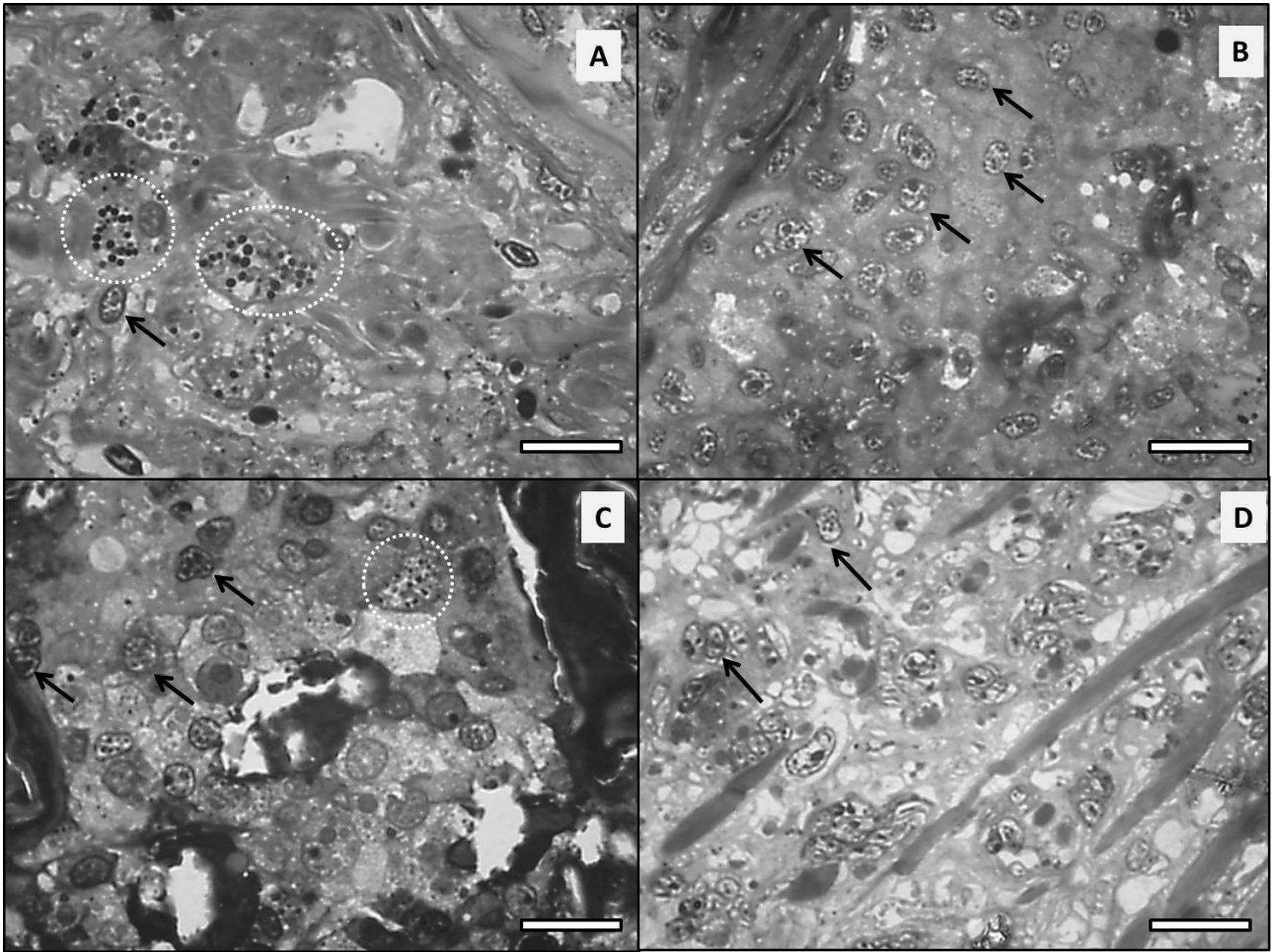


Figure IV.3. Coupes histologiques de tissus de palourdes japonaises, manteau (A + B) et pied (C + D) atteints de la BMD. Les flèches noires indiquent des granulocytes. Les mastocytes avec leurs granulations sont entourés en blanc. Coloration au bleu azur. Barre d'échelle = 25  $\mu$ m

Les analyses en microscopie optique réalisées sur le manteau et le pied des individus malades montrent la présence de tissus nécrosés associés à une forte infiltration de cellules immunitaires témoignant d'une forte réponse inflammatoire. Les muscles adducteurs postérieurs des palourdes utilisées dans cette étude ont également été analysés. Les résultats ne sont pas présentés dans ce chapitre, mais ces derniers sont similaires à ceux obtenus sur le manteau et le pied et confirment les observations réalisées par Dang et al. (2008) sur ce tissu.

Les analyses de MET réalisées sur les deux tissus malades, manteau (Figure IV.4) et pied (Figure IV.5) montrent la présence de particules de types viral (VLPs), comme observé par Dang et al. (2009b) dans le muscle adducteur postérieur. Comme pour la microscopie optique, de nouvelles observations de muscle adducteur postérieur ont été réalisées et sont similaires aux observations faites sur le manteau et le pied et similaires aux résultats présentés par Dang et al. (2009b) sur ce

même tissu. Aucune VLPs n'a été détectée dans les tissus des individus sains (manteau, pied et muscle adducteur).

Les VLPs sont présentes en grande quantités dans les deux tissus malades observés. La concentration en VLPs semble toutefois plus importante dans le manteau que dans le pied.

Certaines VLPs sont libres dans le cytoplasme (Figure IV.4 (a)), alors que d'autres semblent être arrangées, "ordonnées", dans des structures de types paracrystallines (Figure IV.4 (b) IV.5 (B)). La figure IV.4 (B) montre des particules de forme icosaédrique, sans enveloppe et de l'ordre d'une trentaine de nanomètres. Ces critères correspondent à ceux évoqués précédemment par Dang et al. (2009b).

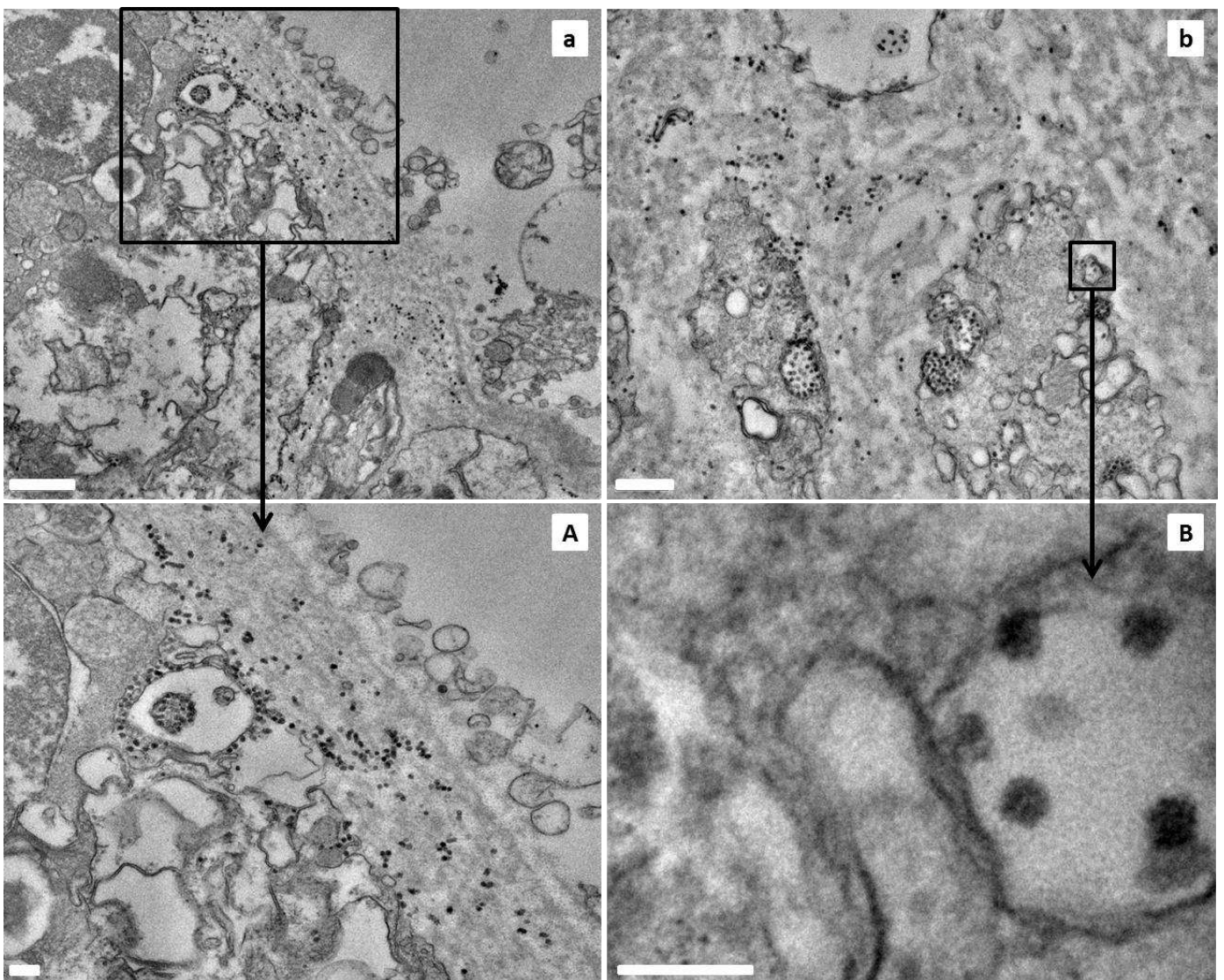


Figure IV.4. Coupes ultrafines de manteau de palourdes japonaises atteintes de la BMD. Les photos (A) et (B) sont des agrandissements des zones délimitées par un cadre noir sur les photos (a) et (b). (a) barre d'échelle = 1  $\mu$ m (b) barre d'échelle = 0,5  $\mu$ m (A) barre d'échelle = 0,2  $\mu$ m (B) barre d'échelle = 100 nm



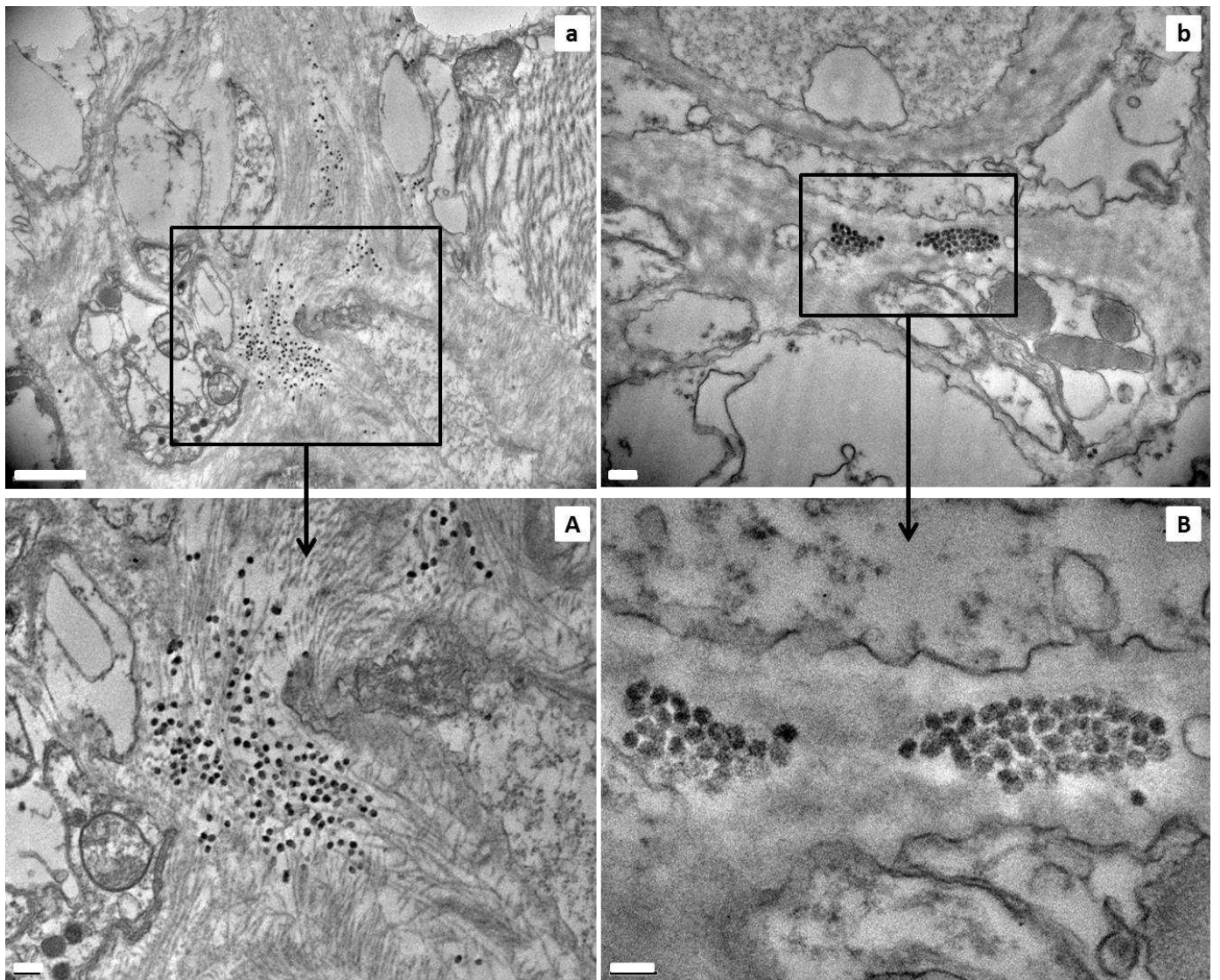


Figure IV.5. Coupes ultrafines de pied de palourdes japonaises atteintes de la BMD. Les photos (A) et (B) sont des agrandissements des zones délimitées par un cadre noir sur les photos (a) et (b).

(a) barre d'échelle = 1  $\mu\text{m}$  (b) et (A) barre d'échelle = 0,2  $\mu\text{m}$  (B) barre d'échelle = 100 nm

## 2. Purification des particules virales sur gradient de sucrose

### 2.1 Matériels et méthodes

#### 2.1.1 Matériel biologique

Quatre-vingt-cinq individus malades, de 28 à 37 mm de longueur de coquille ont été récoltés sur divers sites du bassin d'Arcachon. Trois tissus ont été prélevés, poolés, puis congelés : le muscle adducteur postérieur (6,41 g), le manteau (14,13 g) et le pied (6,80 g).

*NB: les tissus sont pesés congelés.*

#### 2.1.2 Broyage des tissus

Chaque tissu a été broyé séparément avec du sable de Fontainebleau stérile et du milieu GMEM (Eurobio) avec un pilon dans un mortier. Le milieu GMEM a été supplémenté avec de l'amphotéricine B au  $1/100^{\text{ème}}$  (antifongique) et 5 volumes de milieu ont été ajoutés pour chaque préparation (soit respectivement, 32,05 mL; 70,65 mL et 34 mL pour muscle, manteau et pied).

Le sable et les gros débris cellulaires ont été éliminés par deux centrifugations successives de 15 et 5 min (1 700g- 4°C). Les surnageants des trois préparations, 28 mL pour le muscle adducteur et le pied et 62 mL pour le manteau, ont été récoltés puis conservés à -80°C.

#### 2.1.3 Purification 1

Le gradient de sucrose est une superposition de 5 couches de 2,2 mL de solutions de sucrose à 60%-50%-40%-30% et 20% (Tubes SW41). Une solution mère de sucrose 60% a été diluée avec du tampon TEN (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,15 mM) pour obtenir les solutions de 50 à 20%. Les gradients ont été conservés à 4°C pendant au minimum 5 h avant utilisation.

Après le temps de repos, 0,7 mL de broyat de muscle adducteur, pied ou manteau ont été déposés à la surface du gradient (1 gradient pour chaque organe). Les gradients ont ensuite été ultra-centrifugés toute une nuit à 100 000g et 4°C (Ultracentrifugeuse Optima LE 80K).

Les bandes présentes dans le gradient ont été récupérées le lendemain avec une pompe péristaltique et une seringue de 5 mL. Chaque fraction récupérée a été diluée au  $1/5^{\text{ème}}$  avec du tampon TEN puis à nouveau ultra-centrifugée à 100 000g pendant 1 h 30 à 4°C pour être nettoyée.

Les culots ont ensuite été resuspendus dans un faible volume de TEN puis conservés à - 80°C.

### 2.1.4 Purification 2

Avant d'être déposé sur gradient de sucrose, les échantillons ont d'abord été déposés sur un coussin de sucrose à 30% pour éliminer les débris. Pour chaque tissu, 1 mL de broyat a été déposé sur 0,4 mL de sucrose à 30% (tubes TL100). Les tubes ont été ultra-centrifugés 45 min à 160 000g à 4°C. Les surnageants contenant les débris et le coussin de sucrose (Figure IV.6) ont été éliminés à l'aide d'une pompe péristaltique et d'une seringue.

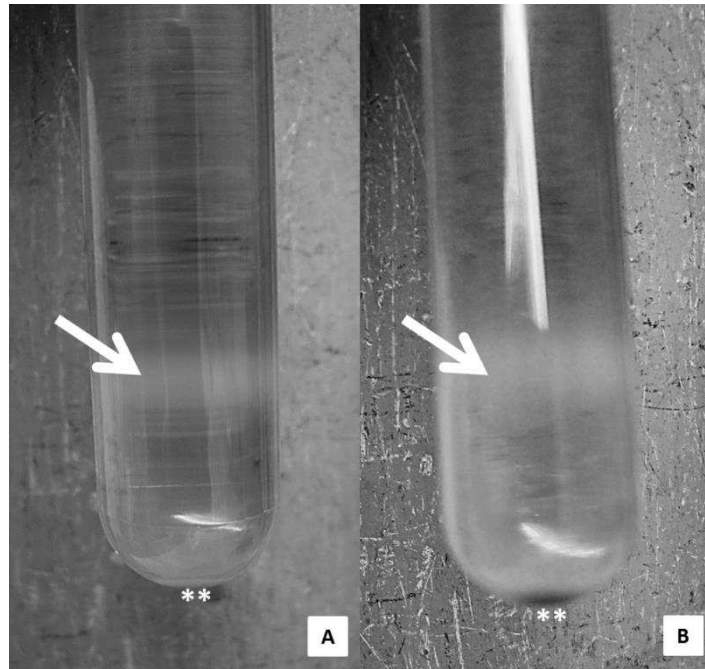


Figure IV.6. Vue de face (A) et vue inclinée (B) du coussin de sucrose 30% après ultracentrifugation (Tubes SW41). La flèche blanche désigne les débris retenus par le coussin de sucrose et les \*\* les particules qui ont sédimenté

Les culots ont ensuite été resuspendus dans 0,3 mL de TEN puis déposés sur gradient de sucrose (Tubes SW41, 2,2 mL de chaque solution de sucrose - 5 h de repos à 4°C), ultra-centrifugés, nettoyés puis resuspendus dans du TEN comme décrit dans le paragraphe précédent. Chaque échantillon a également été analysé au refractomètre pour déterminer sa densité.

### 2.1.5 Purification 3

Pour cette troisième purification, seuls les muscles adducteurs postérieurs ont été utilisés. Six coussins de sucrose à 30% ont été réalisés à raison de 2,5 mL de coussin par tubes (SW41) et de 8 mL de broyat. Les coussins ont été ultra-centrifugés 4 h à 220 000g et 4°C. Les culots ont été repris et resuspendus dans 500 µL de TEN. Les échantillons ont ensuite été déposés sur 3 gradients de



sucrose (Tubes SW28, 7 mL de chaque solution de sucrose), soit 1 mL par gradient puis ultracentrifugés, nettoyés puis resuspendus dans un faible volume de TEN comme décrit précédemment. Chaque échantillon a également été analysé au refractomètre pour déterminer sa densité.

### 2.1.6 Microscopie Electronique à Transmission

La qualité des purifications a ensuite été vérifiée en Microscopie Electronique à Transmission (MET) (Microscope Zeiss EM 902 – plateforme GPL-MIMA2 - INRA Jouy-en-Josas).

Pour chaque échantillon, 5 à 8  $\mu$ L (selon la concentration de l'échantillon) ont été déposés sur une grille. Les grilles ont été colorées pendant 20 s dans de l'acétate d'uranyle à 1% (contrastant) puis observées. La taille des particules a également pu être mesurée (Logiciel iTEM. Olympus)

## 2.2 Résultats-conclusion

### 2.2.1 Utilisation d'un coussin de sucrose 30%

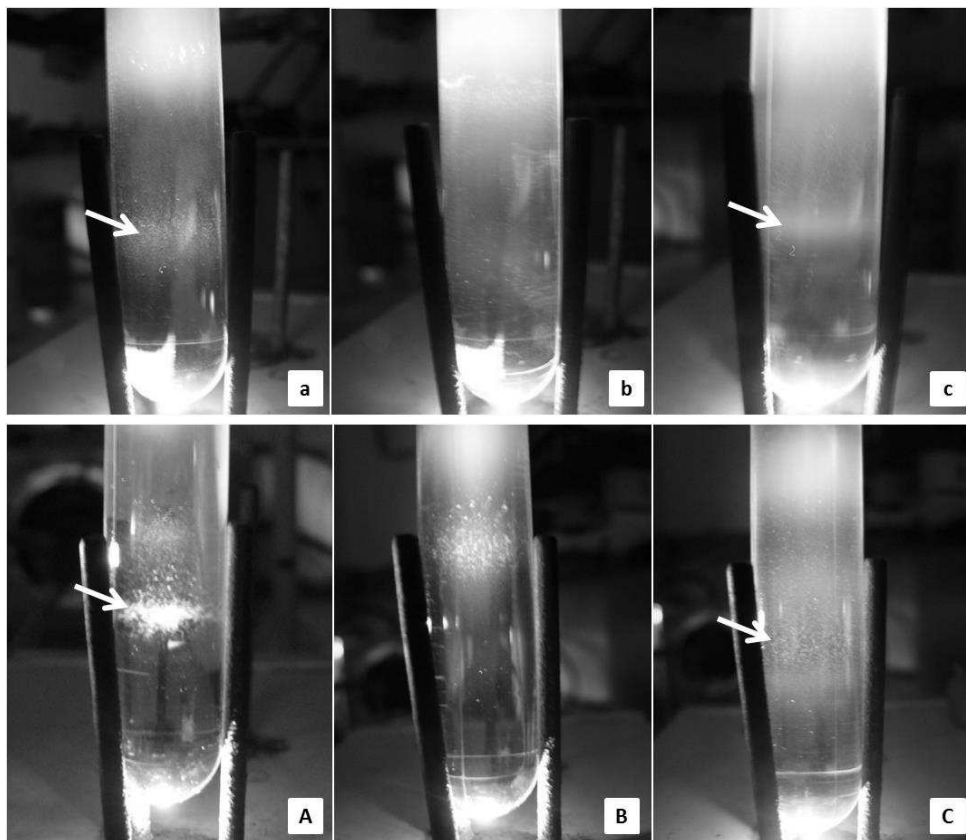


Figure IV.7. Gradient de sucrose après ultracentrifugation pour le muscle adducteur sans (a) ou avec (A) étape préalable sur coussin de sucrose, pour le manteau sans (b) ou avec (B) coussin de sucrose et pour le pied sans (c) ou avec (C) coussin de sucrose. Les flèches blanches indiquent les bandes qui ont été récupérées

Parmi les trois organes étudiés, des bandes ont pu être prélevées pour le muscle adducteur et le pied mais pas pour le manteau (Figure IV.7). La figure IV.7 montre les 6 gradients de sucrose obtenus après ultracentrifugation sans (a → c) ou avec l'étape de nettoyage sur coussin de sucrose à 30% (A → C). Après utilisation d'un coussin de sucrose, la bande pour le muscle adducteur semble plus nette (A) que la bande obtenue sans utilisation préalable du coussin (a). Pour le manteau, aucune bande nette n'est visible dans les deux gradients (b & B). Pour le pied, il n'y a pas de différence notable entre les deux traitements réalisés (c & C).

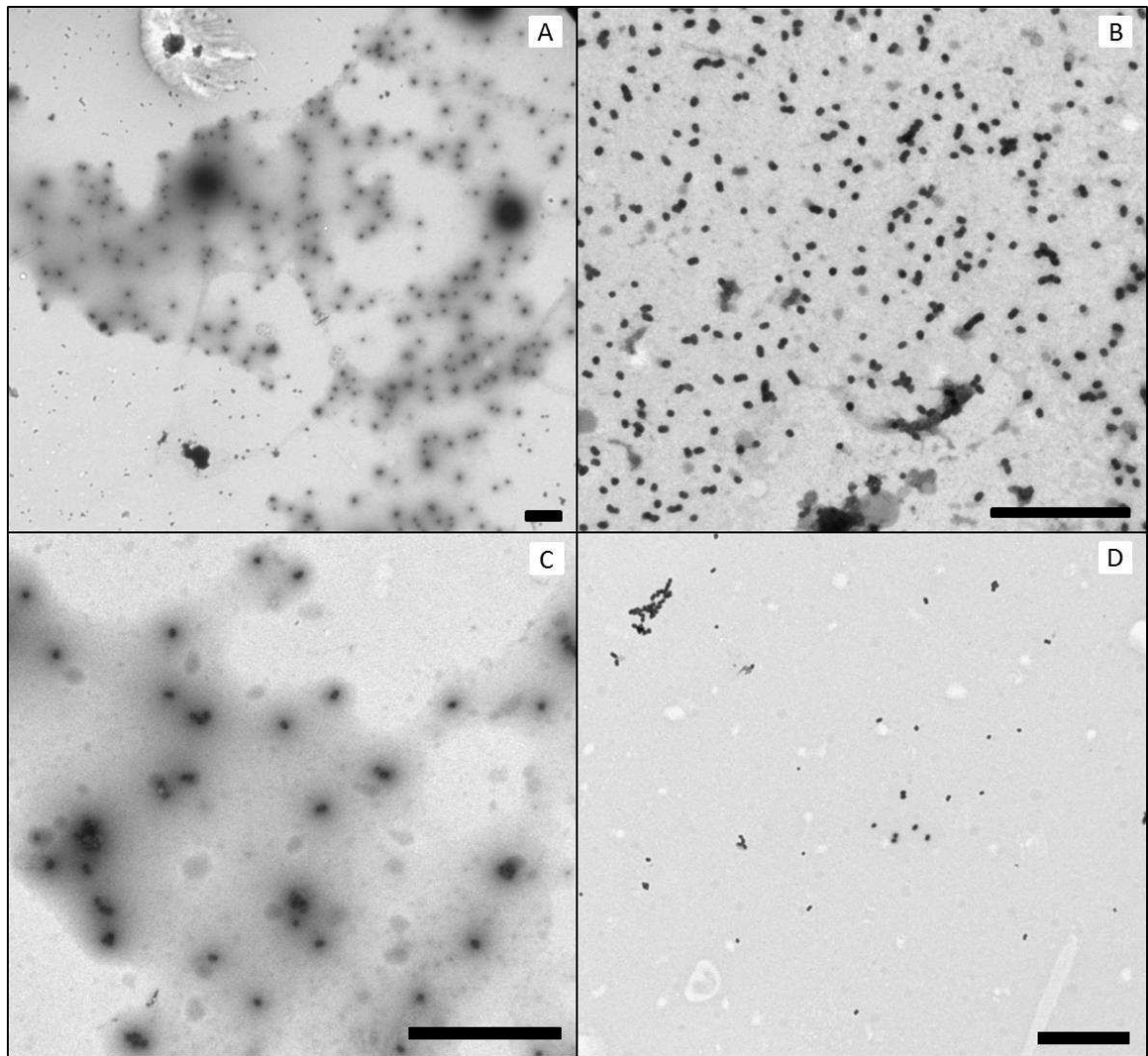


Figure IV.8. Photos en microscopie électronique à transmission des purifications réalisées sur gradient de sucrose pour le muscle adducteur sans étape préalable sur coussin de sucrose (A) ou avec (B) et pour le pied sans (C) ou avec (D) étape préalable sur gradient de sucrose. Contraste acétate d'uranyle 1%. Barre d'échelle = 1 µm

La Figure IV.8 présente les photos de MET réalisées pour les échantillons de muscle postérieur et de pied récoltés après l'ultracentrifugation sur gradient de sucrose. La comparaison des photos réalisées pour les deux organes sans ou avec l'étape de nettoyage sur coussin montre des échantillons plus purs après passages sur les coussins de sucrose (B & D). Les échantillons de muscle semblent également présenter de plus fortes quantités de particules que les échantillons de pied.

L'observation en MET des coupes réalisées sur les différents organes (*Cf* chapitre IV.1) montre de grandes quantités de particules virales dans les tissus des muscles adducteurs et également dans le manteau et le pied. Or, lors de l'étape de purification, seuls les muscles adducteurs permettent d'extraire de fortes quantités de VLPs. Il semblerait que l'étape de purification sur gradient de sucrose (avec utilisation ou non d'un coussin) soit moins efficace sur le pied, voire inefficace en ce qui concerne le manteau.

Un des symptômes de la BMD est une profonde désorganisation des fibres musculaires, voire pour les cas avancés, une disparition de nombreuses structures cellulaires. Cette atteinte tissulaire rend probablement le muscle moins résistant lors de l'étape de broyage, ce qui permet de récupérer une plus grande quantité de particules virales. Pour le pied et le manteau, la majorité des particules reste probablement piégée dans les tissus et est donc éliminée avec les gros débris.

Les indices de réfraction ont permis de mesurer la densité des particules. Pour le muscle, la densité est d'environ  $1,235 \text{ g.cm}^{-3}$  et pour le pied, elle atteint  $1,241 \text{ g.cm}^{-3}$ .

Le principe de l'ultracentrifugation est de déposer la suspension virale sur une colonne de densité croissante, le gradient. Les particules virales migrent dans ce gradient suivant leur grosseur jusqu'à atteindre leur densité de flottaison ou être déposées dans le culot si leur densité excède celle du gradient.

Dans le cas de virus non-enveloppés, comme soupçonné ici, l'utilisation d'un gradient de chlorure de césium (CsCl) est souvent préféré du fait d'une densité maximale plus forte (1,88 pour le CsCl contre 1,30 pour le sucrose). En effet les virus nus sont souvent plus denses que les virus enveloppés (Payment & Trudel 1989). Dans cette étude, la densité des VLPs est compatible avec l'utilisation d'un gradient de sucrose puisque les particules n'ont pas sédimenté. De plus l'utilisation d'un gradient de CsCL a montré de moins bons résultats que l'utilisation d'un gradient de sucrose (préparation moins propre).

### 2.2.2 Purification en grande quantité

Pour les essais de purification en grande quantité (tubes SW28), trois bandes sont observables sur gradient de sucrose (Figure IV.9), une bande haute, une bande moyenne et une bande basse.

Les bandes hautes et moyennes présentent un grand nombre de déchets et assez peu de particules. Ces bandes ont à nouveau été purifiées sur gradient de sucrose pour éliminer ses déchets mais sans succès.

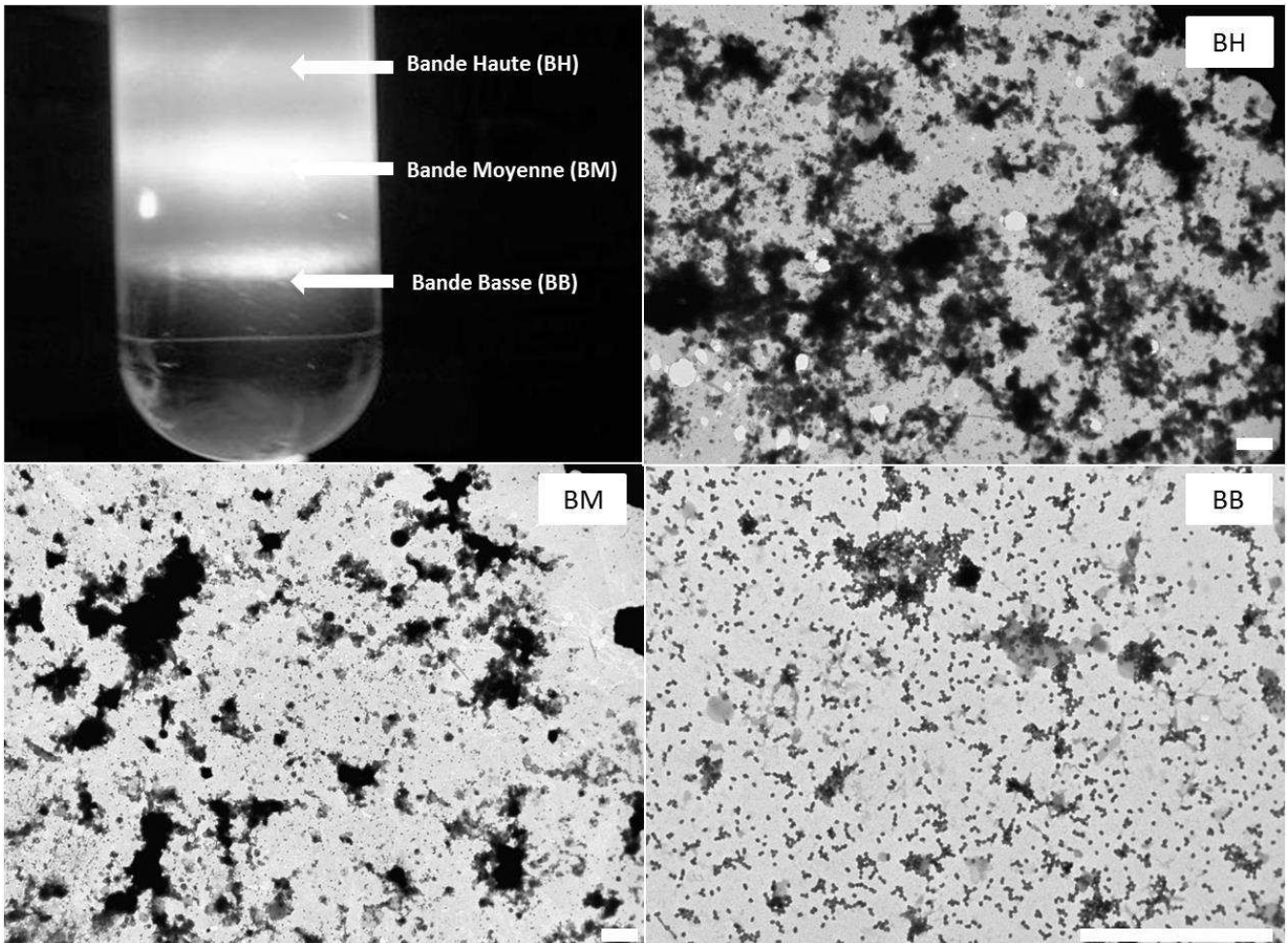


Figure IV.9. Localisation et analyse en microscopie électronique à transmission des 3 bandes, haute (BH), moyenne (BM) et basse (BB) récupérées pour la purification 3 sur du muscle adducteur. Contraste acétate d'uranyle 1%. Barre d'échelle = 1 µm

Seules les bandes basses, relativement propres et très concentrées en particules ont été conservées. Les trois bandes basses récupérées, puis nettoyées, ont été resuspendues dans un volume final de 500 µL.

La réfractométrie donne des densités de l'ordre de  $1,18 \text{ g.cm}^{-3}$  pour la bande haute,  $1,235 \text{ g.cm}^{-3}$  pour la bande moyenne et  $1,269 \text{ g.cm}^{-3}$  pour la bande basse. La taille des particules est de l'ordre de 30 à 40 nm (Figure IV.10) avec certaines particules atteignant également les 50-60 nm.

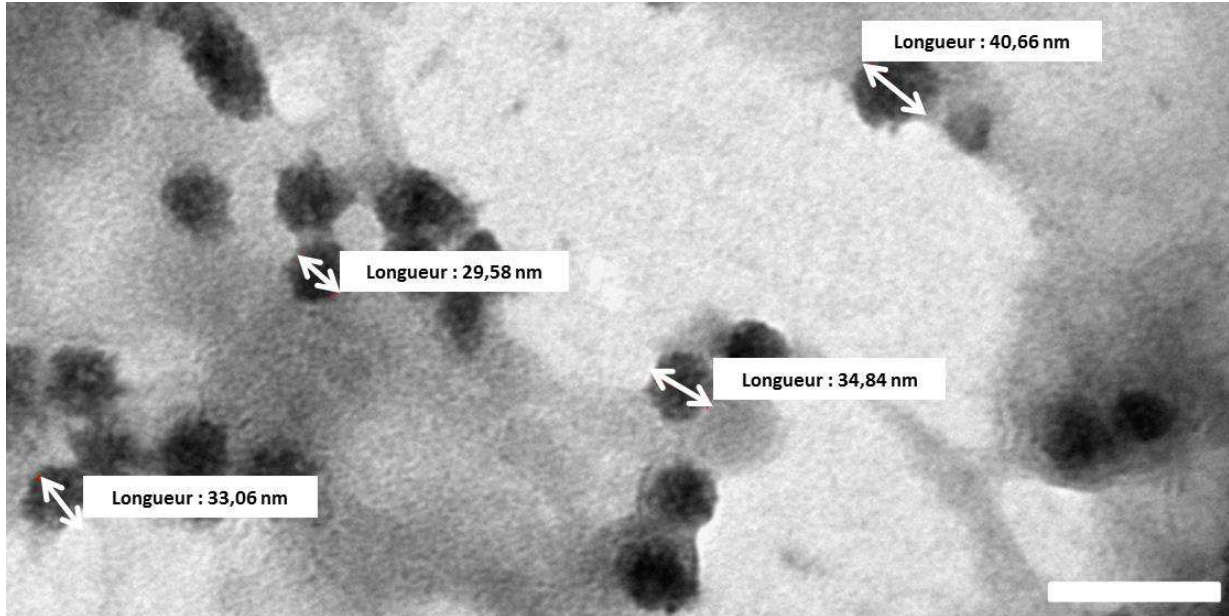


Figure IV.10. Taille des particules mesurées par le logiciel ITEM (Olympus). Echantillon : bande basse.

Contrastant = acétate d'uranyle. Barre d'échelle = 100 nm

### 2.3 Conclusion

Les premières observations en microscopie électronique réalisées par Dang et al. (2009b) suggéraient, de par la petite taille des particules et l'absence visible d'enveloppe, un virus appartenant à la famille des *Picornaviridae*, des *Parvoviridae* ou des *Caliciviridae*. Ces trois familles de virus sont caractérisées par la structure icosaédrique de leur capsid, des tailles de 28-30 nm pour les *Picornaviridae*, 18-26 nm pour les *Parvoviridae*, et 30-38 nm pour les *Caliciviridae*. Les *Papovaviridae*, de forme icosaédrique et de taille 45-55 nm pourraient également répondre aux critères des VLPs observées. Leur génome est constitué d'ARN simple brin linéaire pour les *Picornaviridae* et les *Caliciviridae*, d'ADN simple brin pour les *Parvoviridae* et d'ADN double brin pour les *Papovaviridae*.

Les virus nus étant généralement purifiés sur gradient de CsCl, aucune indication de densité sur les différentes familles soupçonnées en gradient de sucrose n'a été trouvée dans la littérature.

Un moyen d'affiner nos connaissances sur la famille concernée serait de déterminer le type de génome présent dans les particules virales. Cette étude est l'objet du paragraphe 3.

### 3. Identification de la nature du génome et essai de clonage

#### 3.1 ADN ou ARN ?

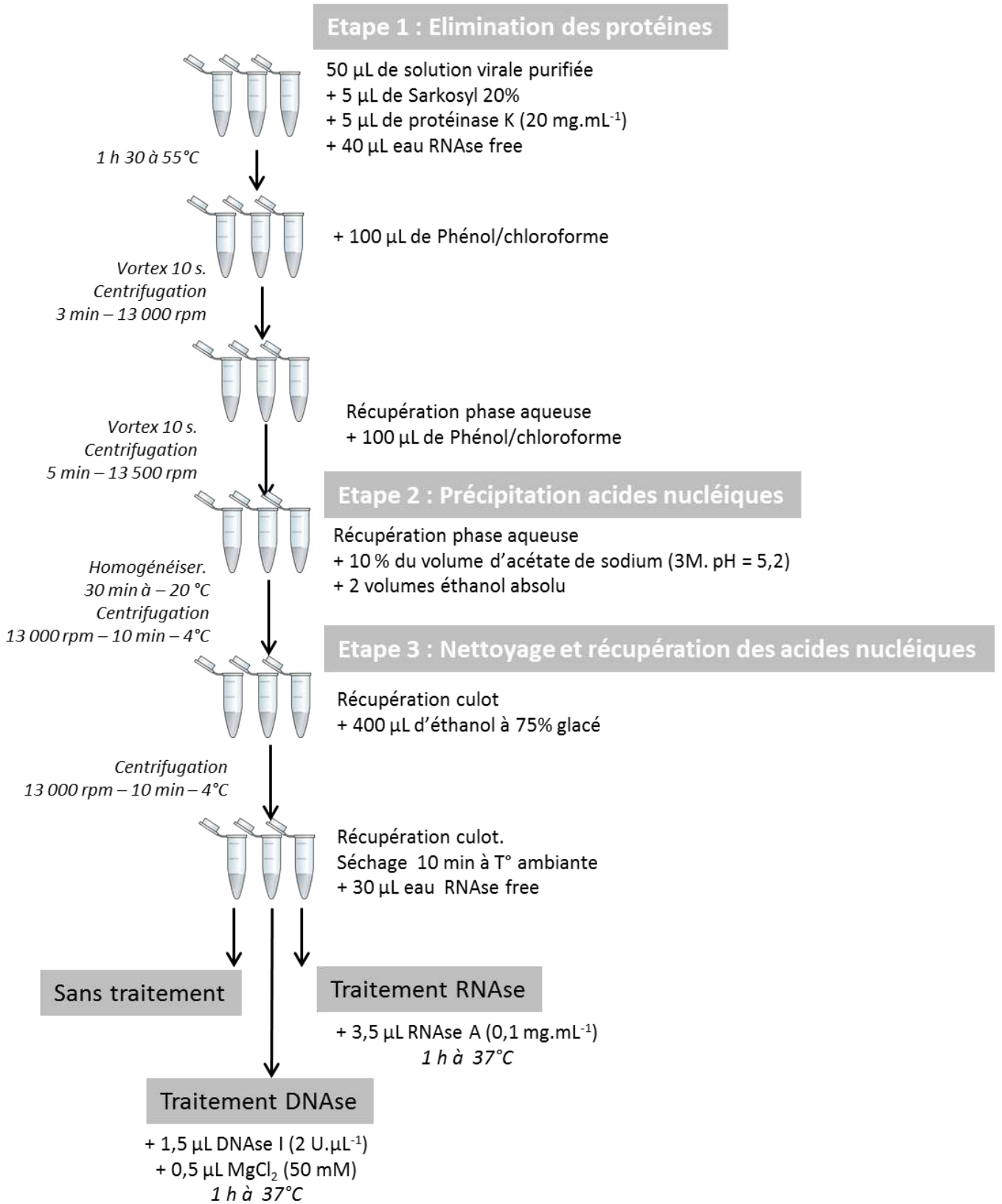


Figure IV.11. Protocole d'extraction des acides nucléiques au phénol-chloroforme

### 3.1.1 Matériels et méthodes

Une extraction au phénol-chloroforme a été réalisée pour isoler les acides nucléiques présents dans les particules virales purifiées sur gradient de sucrose. Le protocole est décrit sur la Figure IV.11.

Après extraction des acides nucléiques deux types de traitement ont été appliqués : traitement soit à la DNase I soit à la RNase A.

### 3.1.2 Résultats-conclusion

Les deux traitements ont été comparés sur gel d'agarose (1%) avec un échantillon n'ayant subi aucun traitement (Figure IV.12)

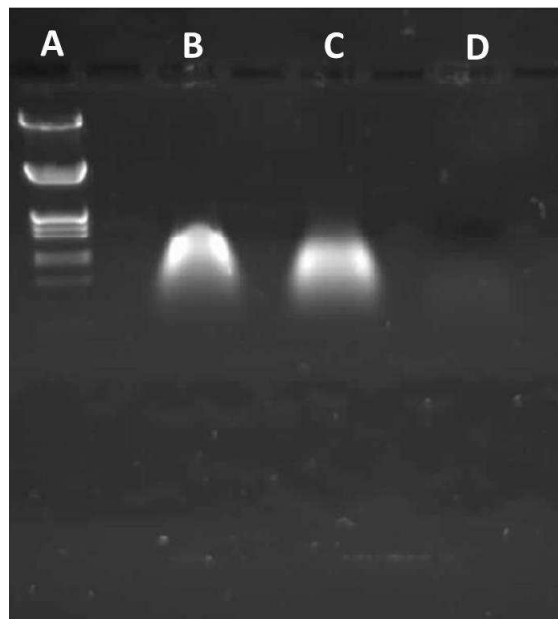


Figure IV.12. Comparaison sur gel d'agarose 1% des échantillons sans traitement (B), avec traitement à la DNase (C) et avec traitement à la RNase (D). (A) = marqueur de taille

Les résultats de cette expérience semblent indiquer que la nature du génome présent dans les VLPs est de l'ARN. Pour vérifier ce résultats, des extractions d'acides nucléiques ont été réalisées sur diverses séries de purifications de VLPs et avec différents protocoles d'extraction avec toujours la même conclusion. Toutefois, la taille du matériel purifié, de l'ordre de 1 kb, est trop faible pour correspondre à un génome viral dans son ensemble. Les plus petits génomes décrits excèdent les 3 kb. L'hypothèse d'une contamination par du génome de l'hôte n'est donc pas à exclure et la nature du génome viral reste à confirmer.

Dans le cadre d'un génome à ARN, nos investigations sur la famille virale se restreindraient aux *Picornaviridae* et aux *Caliciviridae*.



### 3.2 Clonage

#### 3.2.1 Matériels et méthodes

Pour les essais de clonage, de l'ADN double brin a été synthétisé à partir de 2 µg d'ARN récolté et du kit Universal Riboclone cDNA Synthesis System (Promega) suivant les instructions du fabricant. Plusieurs étapes ont été réalisées avec ce kit : la synthèse de l'ADNc, la synthèse du double brin et la ligation des adaptateurs *EcoRI*. En parallèle de l'ARN d'intérêt, un ARN témoin, la Kanamycine a subi le même traitement que les échantillons afin de vérifier le fonctionnement de chacune des étapes.

Le protocole de préparation du plasmide PGEM 7ZF (+) est décrit ci-dessous (Figure IV.13). La digestion du plasmide par *EcoRI* va permettre la ligation de l'ADNc et le traitement à la phosphatase alcaline permet d'éviter que le plasmide ne se referme sur lui-même sans avoir intégré le fragment d'intérêt.

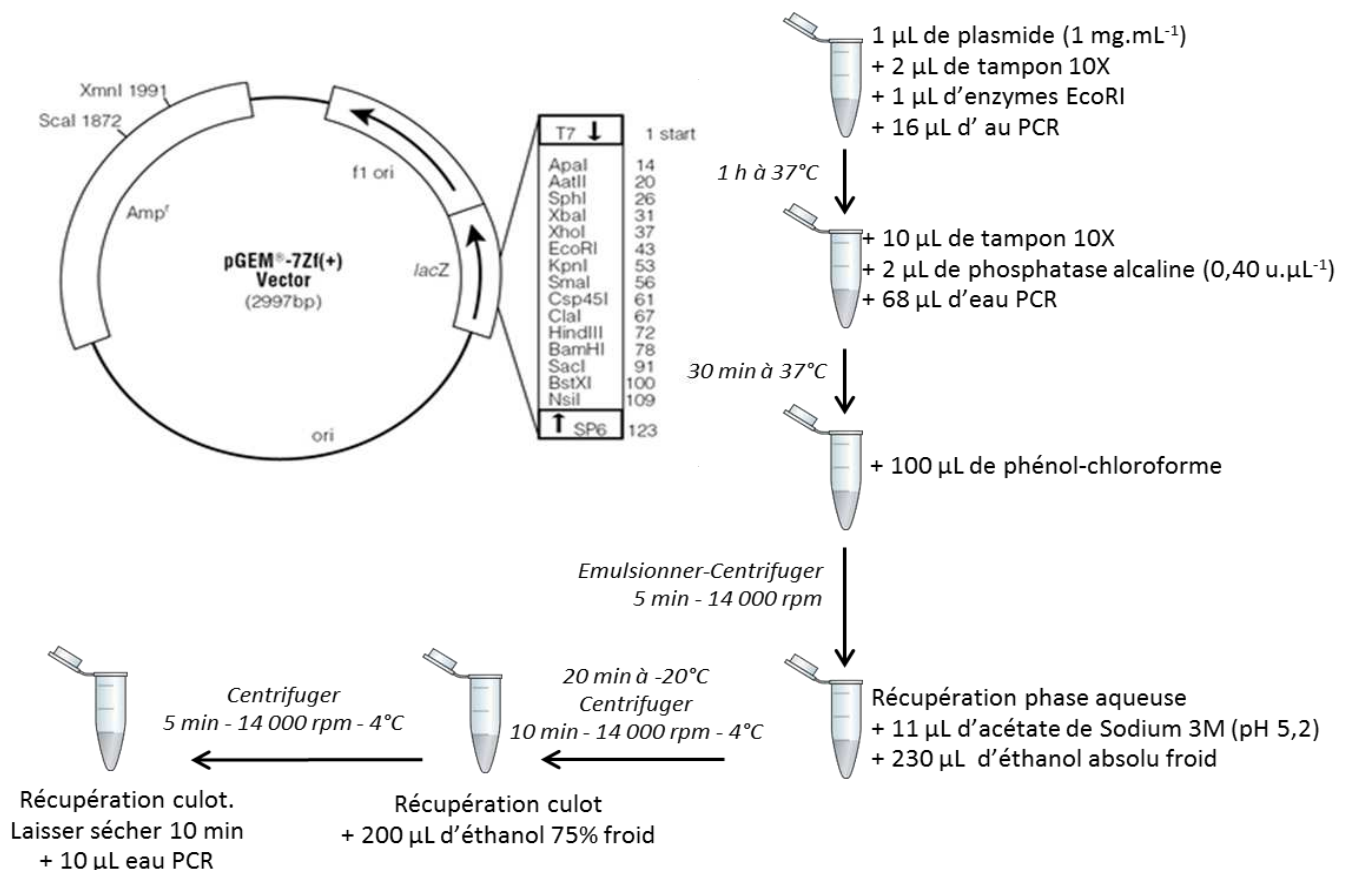


Figure IV.13. Cartographie et protocole de préparation du plasmide PGEM 7ZF (+)



L'ADNc a ensuite été phosphorylé puis intégré dans le plasmide à l'aide du kit Universal Riboclone cDNA Synthesis System (Promega) suivant les instructions du fabricant. Quatre quantités d'ADNc ont été utilisées pour la ligation : 0  $\mu\text{L}$  (tube A); 3  $\mu\text{L}$  (tube B), 2  $\mu\text{L}$  (tube C) et 1  $\mu\text{L}$  (tube D).

Des bactéries *Escherichia coli* compétentes (JM109) ont ensuite été transformées avec ces constructions plasmidiques (2  $\mu\text{L}$  du mélange plasmide + ADNc + 50  $\mu\text{L}$  de bactéries compétentes) par choc thermique 45 s à 42°C. Quatre transformations ont été réalisées pour les quatre tubes A, B, C et D. Du milieu de culture LB (extrait de levure, bactotryptone, NaCl) a été ajouté (950  $\mu\text{L}$ ), puis les tubes ont été placés 1h à 37°C afin de permettre le développement bactérien et l'expression phénotypique du gène de résistance à l'ampicilline présent sur le plasmide PGEM 7ZF (+) (Figure IV.13). Les bactéries transformées (200  $\mu\text{L}$ ) ont été déposées sur 4 boîtes de pétri A, B, C et D (correspondantes aux quatre tubes) contenant du milieu nutritif LB solide supplémenté d'ampicilline (concentration finale 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pour sélectionner les clones transformés. Les bactéries ont été maintenues toute une nuit à 37°C.

Le lendemain, 30 colonies des boîtes B et C ont été repiquées dans du milieu LB liquide supplémenté à 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  d'ampicilline (1 colonie + 2 mL de milieu).

NB : Très peu de colonies sont présentes sur la boîte D. Quelques colonies sont également présentes sur la boîte A.

Les colonies ont été maintenues 4 h à 37°C pour se multiplier puis une PCR a été réalisée sur chaque colonie avec les amorces universelles T<sub>7</sub> / Sp6 comme suit : un cycle à 94°C-5 min puis 40 cycles 94°C - 30 s / 50°C - 30 s / 72°C - 1 min puis un cycle de 10 min à 72°C. Les inserts amplifiés ont ensuite été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% p/v.

### 3.2.2 Résultats-conclusion

Sur les 30 colonies analysées, aucune ne présente un insert de taille supérieure à 250 pb (Figure IV.14). Or, sur le plasmide PGEM 7ZF (+), les promoteurs Sp6 et T<sub>7</sub> sont distants de 123 pb. La taille des fragments obtenus indique que malgré l'étape de déphosphorylation, des plasmides se sont tout de même re-ligués et ont été intégrés par des bactéries, comme en témoigne notamment la présence de colonies sur la boîte correspondant aux tubes A.

NB : dans ce tube, aucun insert n'a été mélangé avec les plasmides. Ceux-ci n'auraient donc en théorie pas pu se re-ligués, ni être intégrés par la bactérie. N'ayant pas le plasmide leur conférant une résistance à l'ampicilline, les bactéries n'auraient pas pu pousser sur le milieu LB + Ampicilline.

Plusieurs tentatives de clonages ont été réalisées mais sans plus de succès. Lors de chaque clonage, aucun insert de taille suffisante ne semblait avoir été intégré dans les plasmides.

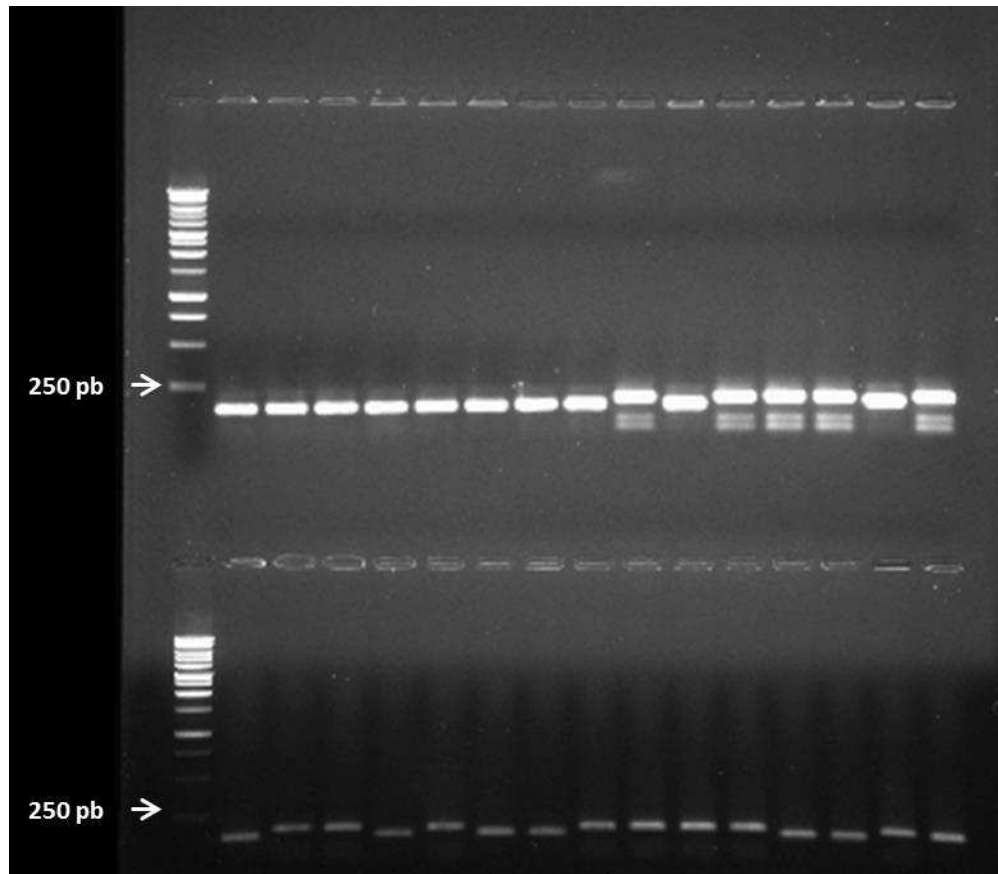


Figure IV.14. Gel d'agarose 1% des 30 colonies (+ marqueur de taille) après l'étape de PCR.

#### 4. Conclusion générale et perspectives de travail

Les résultats obtenus dans ce chapitre sont une première avancée dans l'identification de l'agent étiologique. Les VLPs rencontrées dans les tissus peuvent être purifiées sur gradient de sucrose et semblent présenter un génome à ARN.

Toutefois, l'échec des essais de clonage limite l'avancée de nos connaissances sur l'agent et son mode de fonctionnement, et nous amène à considérer d'autres méthodes d'études.

Trois perspectives ont été envisagées pour améliorer la connaissance du système parasite-hôte et de l'agent lui-même : l'infestation expérimentale, la culture cellulaire et le séquençage haut-débit comparatif entre palourdes présentant ou non la BMD.

Ces trois méthodes font l'objet des trois derniers chapitres de cette thèse. Les avantages et objectifs de ces méthodes seront discutés en introduction de chacun de ces chapitres.



---

## **Chapitre V**

# Infestation expérimentale de palourdes japonaises à partir de "particules virales" purifiées

---

*Collaboration :*

*Christophe Lambert. UMR 6539 Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin – Plouzané*

## 1. Introduction

Suite à des études menées sur la maladie de l'anthrax et l'agent qui en est responsable, *Bacillus anthracis*, Robert Koch (1843-1910), médecin allemand, énonce quatre postulats, appelés désormais postulats de Koch qui restent parmi les fondements de la microbiologie et de l'étude des maladies infectieuses. L'identification d'un micro-organisme comme étant l'agent responsable d'une maladie repose sur ces 4 postulats :

- Le micro-organisme doit être présent en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais absent des organismes sains.
- Le micro-organisme doit pouvoir être isolé de l'organisme malade et cultivé *in vitro*.
- Le micro-organisme cultivé doit entraîner l'apparition de la maladie lorsque introduit dans un organisme sain.
- Le micro-organisme doit être à nouveau isolé du nouvel organisme hôte rendu malade puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original.

Bien que cette vision restrictive où seul l'agent pathogène est responsable de l'expression d'une maladie ait été fortement étendue depuis plusieurs décennies, intégrant notamment l'influence de la physiologie de l'hôte et des divers facteurs environnementaux sur la maladie (Casadevall & Pirofski 1999, 2003), l'utilisation de ces postulats pour déterminer l'étiologie d'une maladie reste encore d'actualité (Lipkin 2009).

Les études sur le choléra et la tuberculose réalisées par Koch l'ont amené très vite à revoir lui-même ses propres postulats. La seconde partie du premier postulat ("mais absent des individus sains") a finalement été rejetée suite à la découverte de porteurs sains de la bactérie *Vibrio cholerae*, responsable du choléra.

Le troisième postulat a quant à lui été nuancé suite à la découverte dans les cas de la tuberculose et du choléra d'organismes exposés à l'infection mais ne développant pas la maladie.

En plus de l'aspect identification de l'agent étiologique, l'utilisation de méthodes d'infection expérimentale s'avère très utile dans l'étude du système hôte-parasite, notamment du mode d'action de l'agent étiologique et de l'épidémiologie de la maladie. De nombreux paramètres peuvent être suivis (moléculaires, cellulaires, comportementaux) et ce dans des conditions contrôlées, en s'affranchissant d'un échantillonnage de terrain d'individus malades contraint par la

disponibilité en individus malades et par des paramètres de taille/âge ou des paramètres environnementaux non contrôlés.

Chez les mollusques bivalves, ces expériences sont d'autant plus importantes du fait de l'absence de lignées cellulaires (Rinkevich 1999 & 2005, Yoshino et al. 2013) qui sont souvent utilisées pour des études dans les domaines de l'immunologie, la physiologie ou de la toxicologie. Des infections expérimentales ont été réalisées pour l'étude des maladies comme par exemple celles liées aux protozoaires *Perkinsus* spp. chez *Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *Venerupis philippinarum* et *V. decussata* (Revue de Soudant et al. 2013), *Bonamia* spp. chez *Ostrea edulis* (Harrang 2012), au virus de type herpes chez *C. gigas* (Schikorski et al. 2011a-b), aux bactéries du genre *Vibrio* sur *V. philippinarum* et *V. decussata* (Paillard 2004), *C. gigas* (Labreuche et al. 2006) et *Mytilus galloprovincialis* (Canesi et al. 2010) ou encore à l'acute virus necrobiotic virus (AVNV) chez *Chlamys farreri* (Xing et al. 2008).

L'utilisation de la microscopie électronique à transmission et des méthodes de purification sur gradient de sucrose (Cf Chapitre IV) nous ont déjà permis de détecter la présence des particules virales dans l'ensemble des individus présentant la maladie et de les purifier. Dans cette étude, l'objectif est de tenter de satisfaire au 3<sup>ème</sup> postulat de Koch, en recréant la maladie chez des individus n'en présentant aucun signe.

Lors du suivi terrain (Cf Chapitre 3), la comparaison entre individus sains et individus malades a montré une nette influence de la maladie sur les paramètres cellulaires et moléculaires.

L'étape suivante consiste ici à regarder l'influence de l'infestation expérimentale sur trois paramètres immunologiques: i) la concentration totale en hémocytes, ii) le taux de phagocytose, et iii) la capacité de phagocytose, et également de distinguer ou non une atteinte moléculaire sur des fonctions telles que le métabolisme mitochondrial, la réponse au stress oxydant ou la détoxification. Pour cette étude, quatre dilutions de virus seront testées afin d'évaluer un effet dose-dépendant et les résultats seront comparés à ceux provenant d'une condition témoin.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Matériel biologique

Une solution mère (500  $\mu\text{L}$ ) de particules virales purifiées a été obtenue comme décrit précédemment (Cf chapitre IV) à partir des muscles adducteurs postérieurs (MPI 1 à 4, Cf introduction générale 2.3.1.1) de 85 palourdes d'une longueur de coquille comprise entre 30 et 40 mm et récoltées en janvier 2011 sur le site A (Figure V.1).

En mars 2011, 375 palourdes japonaises en position enfouie (= position "normale") de 29 à 32 mm ont été récoltées sur le site B (Figure V.1) puis acclimatées pendant 2 semaines (15°C- Salinité 30) pour être ensuite infestées. Ces deux sites ont été choisis d'une part pour leur forte densité en palourdes (A – 29 ind. $\text{m}^{-2}$  ; B- 49 ind. $\text{m}^{-2}$ ) et pour la prévalence de la BMD, élevée pour le site A (8 %) et faible pour le site B (2 %).



Figure V.1. Localisation des deux sites d'échantillonnage A (palourdes malades) et B (palourdes saines) sur le bassin d'Arcachon

### 2.2 Schéma expérimental

Quatre dilutions de la solution mère virale ont été utilisées, 1/100<sup>ème</sup>, 1/1000<sup>ème</sup>, 1/5000<sup>ème</sup> et 1/10000<sup>ème</sup> ainsi qu'une solution contrôle d'eau de mer filtrée (0,22  $\mu\text{m}$ ). L'infestation des palourdes a été réalisée par baignade individuelle dans 100 mL d'eau de mer filtrée (0,22  $\mu\text{m}$ ) + 10  $\mu\text{L}$  de la solution virale (ou eau de mer filtrée). Une solution stock a été préparée pour chacune des 4 dilutions afin d'obtenir la dilution finale souhaitée.

Après 24 h de balnéation ( $J_1$ ) les palourdes ont été réparties dans 15 unités expérimentales (U.E.) d'eau de mer filtrée ( $0,22 \mu\text{m}$ ) de 12 L, à raison de 25 palourdes par U.E. et de 3 U.E. pour chaque dilution (= condition) de virus + la condition témoin. Les U.E. ont été maintenues à une température constante de  $15^\circ\text{C}$  et une salinité moyenne de 30, sans renouvellement d'eau et avec une pompe à air.

Le jour de la balnéation puis, à + 1 jour, + 2 jours, + 4 jours et + 7 jours après le début de la balnéation, appelés respectivement  $J_0$ ,  $J_1$ ,  $J_2$ ,  $J_4$  et  $J_7$ , six palourdes de chaque condition ont été analysées (2 par aquarium = 30 individus sauf pour  $J_0$  = 6 individus).

*NB : à  $J_0$ , les palourdes sont prélevées avant le début de la balnéation et donc il n'y a qu'une seule condition, la condition témoin.*

Les analyses immunologiques et génétiques ont été réalisées sur chacun de ces échantillons.

### 2.3 Données immunologiques

Entre 0,5 et 1 mL d'hémolymphe ont été prélevés dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue stérile. Les échantillons présentant des débris (phytoplancton, particules, bactéries...) ont été éliminés (*NB : le cas échéant, une autre palourde est prélevée*). L'hémolymphe a été filtrée sur une maille de  $80 \mu\text{m}$  puis conservée dans de la glace pour limiter l'agrégation des hémocytes.

Pour mesurer le nombre total d'hémocytes,  $100 \mu\text{L}$  d'hémolymphe ont été dilués dans  $100 \mu\text{L}$  d'eau de mer filtrée stérile (EMFS) puis fixés avec  $200 \mu\text{L}$  d'une solution de formaldéhyde (6,4% + EMFS).

Pour l'analyse de la phagocytose,  $200 \mu\text{L}$  d'hémolymphe ont été incubés avec  $40 \mu\text{L}$  d'une solution de billes de latex fluorescentes (Fluoresbrite TM plain YG-2.0  $\mu\text{m}$  microspheres 2.5% solids-latex. Polysciences, Inc, Warrington, PA 18976) mimant des micro-organismes. Les échantillons ont été incubés 2 h à  $18^\circ\text{C}$  puis la phagocytose a été stoppée par ajout de  $240 \mu\text{L}$  d'une solution de formaldéhyde (6,4% + EMFS).

L'ensemble des échantillons a été conservé à  $4^\circ\text{C}$  et à l'obscurité jusqu'à analyse en cytométrie en flux. Les analyses ont été réalisées dans un délai maximal d'une semaine sur le cytomètre en flux FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA).

Le nombre total d'hémocytes est estimé en ajoutant  $4 \mu\text{L}$  d'un intercalant de l'ADN, le SYBRgreen aux  $400 \mu\text{L}$  de l'échantillon. Cet agent intercalant émet une fluorescence verte qui est mesurée par le détecteur FL1 du cytomètre. La concentration en hémocytes a été déterminée en cellules. $\text{mL}^{-1}$  (Marie et al. 1999).



Concernant la phagocytose, les billes de latex qui fluorescent également dans le vert sont détectées via le détecteur FL1. Le taux de phagocytose a été défini comme le pourcentage de cellules, dites cellules actives, ayant ingéré au moins deux billes fluorescentes. La capacité de phagocytose est définie comme le nombre moyen de billes ingérées par les cellules actives. Les analyses des données de cytométrie ont été réalisées sur le logiciel WinMDI 2.8.

#### 2.4 Analyse génétique

Pour chacun des deux organes utilisés, le muscle adducteur postérieur et la glande digestive, 40 mg de tissus ont été prélevés puis conservés à -80°C dans du RNA later (limite la dégradation des ARNs) jusqu'à analyses.

Les ARNs totaux ont été extraits suivant les instructions du fabricant avec le kit RNA Miniprep (Agilent technologies) puis rétro-transcrit en ADNc avec le kit cDNA synthesis (Agilent technologies). La PCR en temps réel a été réalisée sur le thermocycleur Lightcycler (Roche). Chaque réaction contient 17  $\mu$ L d'un mélange de réactifs contenant du SYBRgreen I pour suivre le processus d'amplification, de 2  $\mu$ L de la paire d'amorces spécifiques du gène d'intérêt à une concentration finale de 300 nM par amorce et de 1  $\mu$ L de l'ADNc. Les séquences des amorces des 5 gènes suivis et du gène de référence ( $\beta$ -actine) ainsi que leurs numéros d'accèsion dans le GenBank sont regroupés dans le tableau V.1.

Tableau V.1. Séquences nucléotidiques, fonctions et numéros d'accèsion des gènes utilisés. a) amorce sens et b) amorce anti-sens

GENE	FONCTION	Numéro d'accèsion	SEQUENCE 5'-3' a) Amorce sens b) Amorce anti-sens
$\beta$ -actine ( <i>act</i> )	Gène de référence	EF520696 (Paul-Pont 2010)	a) CGCACTTCCTCACGCCATCAT b) CATTCTTGTTCAAAGTCCAAG
Cytochrome C oxydase sous-unité 1 ( <i>cox-1</i> )	Métabolisme mitochondriale	HQ703309 (Chen et al. 2011)	a) GTACCCTCCGTTGTCGTC b) CCTGTTACTCCTAAACCAAG
ARNr 16S ( <i>16S</i> )		AB065375 (Okazaki & Ueshima. Unpublished)	a) AGAAGACCCTGTGCGAG b) TTACGGCTGTTATCCCT
Super oxyde dismutase mitochondriale ( <i>sod</i> )	Réponse au stress oxydant	JQ362416 (Umasuthan et al. 2012)	a) GATAATGTTGATCATGCTGGACC b) GTCTACATCAGCGTGAACGACAA
Catalase ( <i>cat</i> )		EF520699 (Paul-Pont 2010)	a) CTGATGGCTACAGACAGATC b) GTTGCCCTGGGCGATG
Metallothionéines ( <i>mt</i> )	Détoxication	AJ249686 (Moraga & Tanguy. Unpublished)	a) GCAAGTGTTCCGACCAATG b) CGAGCAGTCGTTGCCA

Le programme d'amplification a été déterminé comme suit : un cycle de 10 min à 95°C suivi de 50 cycles à 5s-95°C, 5s-60°C, 20s-72°C. La quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt a été obtenue en comparant le cycle de sortie du gène d'intérêt au cycle de sortie du gène de référence ( $\Delta CT = \text{cycle de sortie du gène d'intérêt} - \text{cycle de sortie de la } \beta\text{-actine}$ ).

Les facteurs d'induction (IF) et de répression des gènes ont été déterminés par la méthode décrite par Livak & Schmittgen (2001) des  $2^{-\Delta CT}$  dont la formule est décrite ci-dessous pour le  $J_1$  et la dilution 1/10000<sup>ème</sup>. La même méthode a été appliquée pour chacune des dilutions et à  $J_2$ ,  $J_4$  et  $J_7$ , et pour chacun des 5 gènes suivis. L'expression des gènes pour chacune des dilutions a été comparée à l'expression de ce gène pour les individus contrôle.

$$IF = 2^{-\Delta CT \text{ (Dilution 1/10000ème- } J_1)} / 2^{-\Delta CT \text{ (contrôle } J_1)}$$

### 2.5 Analyse statistique

L'ensemble des tests statistiques a été réalisé sous le logiciel STATISTICA 7.1 avec un seuil de significativité de 5%. La normalité des données a été admise et l'homoscédasticité vérifiée à l'aide du test de Cochran. Une transformation  $\log(X+1)$  a été réalisée pour les données présentant une hétérogénéité des variances.

Les effets de la concentration en virus et de la durée de l'expérience ont été comparés à l'aide d'une ANOVA factorielle. Les moyennes ont ensuite été comparées à l'aide du test *a posteriori* de Tukey.

### 3. Résultats

Pour l'ensemble des palourdes disséquées au cours de l'expérience, soit 126 individus (infestées + témoins), aucune ne présentait de signes de la BMD.

#### 3.1 Données immunologiques

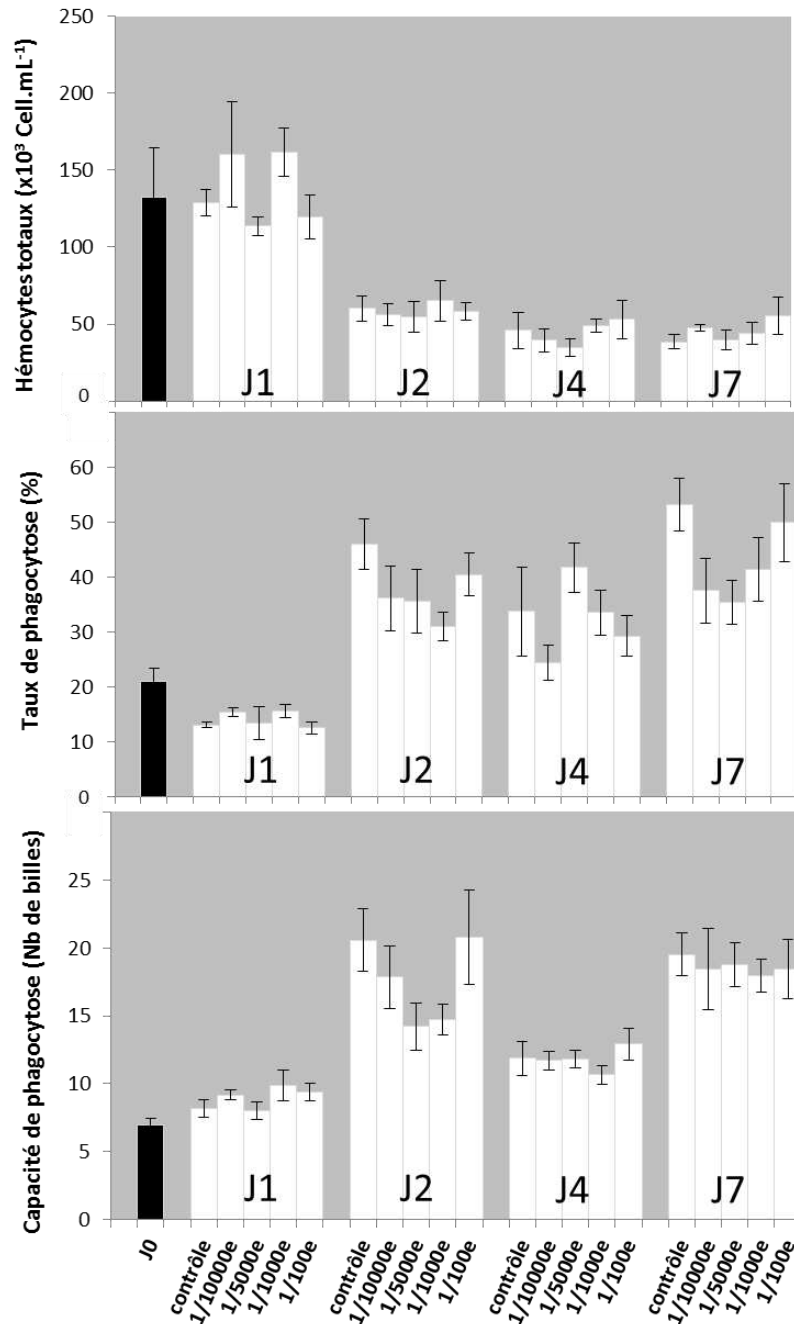


Figure V.1 Moyenne ( $\pm$  erreur standard) des données immunologiques: concentration en hémocytes totaux (cellules.mL<sup>-1</sup>), taux de phagocytose (%) et capacité de phagocytose (nombre de billes par cellule active) pour les 5 jours suivis et les 5 conditions. Chaque histogramme correspond à 6 palourdes analysées

Pour les trois paramètres immunologiques suivis, le nombre total d'hémocytes, le taux de phagocytose et la capacité de phagocytose, l'ANOVA factorielle montre une influence significative du temps mais pas de la présence ou de la dilution de virus utilisée (Tableau V.2).

Pour la concentration en hémocytes, J<sub>0</sub> et J<sub>1</sub> présentent des valeurs similaires et deux fois plus élevées que J<sub>2</sub>, J<sub>4</sub> et J<sub>7</sub> qui présentent aussi des moyennes équivalentes. Pour le taux et l'activité de phagocytose, J<sub>0</sub> et J<sub>1</sub> présentent aussi des valeurs similaires et significativement différentes de J<sub>2</sub>, J<sub>4</sub> et J<sub>7</sub> qui présentent des moyennes similaires. Cependant, le taux et l'activité de phagocytose sont plus importants (x3) à J<sub>2</sub>-J<sub>4</sub>-J<sub>7</sub> qu'à J<sub>0</sub>-J<sub>1</sub> (Figure V.1).

Pour l'ensemble des jours suivis et pour les trois paramètres analysés, des valeurs similaires ont été obtenues entre les 4 dilutions du virus mais également entre les dilutions du virus et la condition témoin (Figure V.1. Tableau V.2).

Tableau V.2 Résultats de l'ANOVA factorielle comparant l'influence du jour de l'expérience (Temps) et/ou de la dilution virale utilisée (Dilution). ddl = degré de liberté, F = variance inter-groupe / variance intra-groupe et p = p-value. Les lettres indiquent une différence significative entre deux valeurs

		ANOVA Factorielle		
		ddl	F	p
Concentration totale en hémocytes (Cellules.mL <sup>-1</sup> )	Temps	4	<b>51,89</b>	< <b>0,001</b>
	Dilution	4	1,20	0,319
	Temps x dilution	16	0,85	0,597
Taux de phagocytose (%)	Temps	4	<b>69,39</b>	< <b>0,001</b>
	Dilution	4	1,14	0,34
	Temps x dilution	16	1,86	0,051
Capacité de phagocytose (Nb de billes)	Temps	4	<b>57,60</b>	< <b>0,001</b>
	Dilution	4	1,61	0,060
	Temps x dilution	16	1,81	0,059

### 3.2 Analyse génétique

#### 3.2.1 Muscle postérieur

A J<sub>1</sub>, aucune différence d'expression des gènes n'a été notée dans le muscle postérieur (Tableau V.3). A J<sub>2</sub>, une répression (x0,3) est notée pour le gène *sod* et une forte induction du gène *mt* pour respectivement les dilutions 1/5000<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup>. A J<sub>4</sub>, le gène *cox-1* est tantôt induit, tantôt réprimé et une induction est notée pour le gène *cat* (dilution 1/10000<sup>ème</sup>) et pour le gène *mt* (dilution 1/5000<sup>ème</sup>). A J<sub>7</sub>, diverses inductions sont notées sauf pour le gène *mt* (Tableau V.3). La comparaison des conditions témoins à J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, J<sub>4</sub> et J<sub>7</sub> avec les témoins prélevés à J<sub>0</sub> montre une

induction significative des gènes *cox-1* ( $p < 0,001$ ), *16S* ( $p < 0,001$ ), *sod* ( $p < 0,001$ ), et *cat* ( $p = 0,04$ ) ainsi qu'une répression significative du gène *mt* ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.2 Glande digestive

Pour la glande digestive, une induction du gène *cat* est notée à  $J_1$  pour les dilutions  $1/10000^{\text{ème}}$  et  $1/5000^{\text{ème}}$  (Tableau V.3). Aucune autre induction ou répression n'a été observée pour le reste de l'expérience.

Contrairement aux résultats obtenus dans le muscle, la comparaison des conditions témoins à  $J_1$ ,  $J_2$ ,  $J_4$  et  $J_7$  avec les témoins prélevés à  $J_0$  dans la glande montre une induction seulement pour le gène *16S* ( $p = 0,003$ ).

Tableau V.3 Expression relative des gènes d'intérêts (comparés à la  $\beta$ -actine) dans le muscle adducteur postérieur et la glande digestive. - : aucune différence significative d'expression du gène entre la dilution et la condition contrôle;  $< 1$  : inhibition significative du gène par rapport à la condition contrôle;  $> 1$  : induction significative

		Muscle adducteur postérieur					Glande digestive				
		<i>cox-1</i>	16S	<i>sod</i>	<i>cat</i>	<i>mt</i>	<i>cox-1</i>	16S	<i>sod</i>	<i>cat</i>	<i>mt</i>
<b>J<sub>1</sub></b>	$1/10000^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	-
	$1/5000^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7	-
	$1/1000^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$1/100^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>J<sub>2</sub></b>	$1/10000^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$1/5000^{\text{ème}}$	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
	$1/1000^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$1/100^{\text{ème}}$	-	-	-	-	8,7	-	-	-	-	-
<b>J<sub>4</sub></b>	$1/10000^{\text{ème}}$	2	-	-	2,6	-	-	-	-	-	-
	$1/5000^{\text{ème}}$	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-
	$1/1000^{\text{ème}}$	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$1/100^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>J<sub>7</sub></b>	$1/10000^{\text{ème}}$	-	3,4	2,4	-	-	-	-	-	-	-
	$1/5000^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$1/1000^{\text{ème}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$1/100^{\text{ème}}$	4,5	-	-	4,9	-	-	-	-	-	-

#### 4. Discussion

Pour l'ensemble des paramètres immunologiques et génétiques suivis, aucune différence significative n'a été notée entre les témoins et les différentes concentrations de virus, et ce pour les quatre temps de suivi. Diverses hypothèses pourraient expliquer l'absence de réponse des individus et concernent soit les particules virales utilisées soit la cinétique de la maladie.

D'après Sader (1982 dans Maitre-Allain 1983), les capacités de filtrations des palourdes à cette période (hiver-printemps) sont de l'ordre de  $20 \text{ L.jour}^{-1}$ . On peut donc supposer que l'ensemble des particules virales utilisées lors de la baignade a rapidement été ingéré par la palourde. Les quantités de particules virales utilisées étaient donc peut être insuffisantes pour obtenir une réaction des individus. D'autre part, les divers traitements subis par les particules lors des étapes de purification pourraient avoir limité, voire inhibé, leur pouvoir infectieux.

Une autre hypothèse serait la nécessité d'un autre organisme hôte tel que des espèces du phytoplancton pour assurer la pénétration du virus et donc le succès d'infestation par des particules virales dans la palourde. De nombreux exemples de virus infectant des organismes phytoplanctoniques ont été décrits (Jacquet & Bratbak 2003, Brussaard 2004, Singh et al. 2004, Tomaru et al. 2009). Une telle hypothèse pourrait expliquer qu'il existe une taille minimale des palourdes pour l'apparition de la maladie. En effet, la taille des particules ingérées par la palourde est dépendante de sa taille et de ses capacités de filtration et peut donc évoluer au fil du temps (Le Treut 1986). Un hôte intermédiaire contenant le virus, et n'apparaissant que tardivement dans le régime alimentaire des palourdes, pourrait donc être envisagé et expliquerait l'échec relatif de notre expérience d'infestation.

Il pourrait également exister un temps de latence important avant que l'organisme ne réagisse à l'infection comme cela peut être le cas notamment pour les virus de type herpès (Renault & Novoa 2004). Toutefois, des infestations expérimentales de larves d'huîtres par du virus de type herpès présentaient les premiers effets sur le comportement et la mortalité dès 48 h et des mortalités supérieures à 80% dès 6 jours (Deniau 2000, Schikorski et al. 2011b).

D'après « the epidemiological triad » de Snieszko (1974), déjà évoqué dans l'introduction générale de cette thèse, une maladie se situe à l'intersection entre un hôte, un pathogène et un environnement. Si les conditions environnementales ne sont pas "favorables", la maladie peut ne pas se déclarer. L'importance de conditions stressantes a déjà été mise en évidence pour des larves

d'huîtres infestées par de l'herpesvirus qui montrent des taux de mortalité plus élevés dans des conditions stressantes (Renault, unpublished data).

Nos résultats présentent un effet du temps d'expérimentation sur les paramètres mesurés qui est indépendant de la présence ou de l'absence de virus. Dès  $J_2$ , la quantité d'hémocytes chute de moitié alors que le taux et la capacité de phagocytose sont multipliés par 3. A ces résultats s'ajoute une surexpression très forte des gènes *cox-1*, *16S*, *sod* et *cat* et une répression du gène *mt* par rapport au lot contrôle de  $J_0$  (uniquement dans le muscle adducteur). Il semble donc que, indépendamment de l'ajout ou non de particules virales, la balnéation ait entraîné une forte réaction des individus. Cette réaction reste inexpliquée (contamination par les fèces?) mais elle aurait pu masquer l'apparition d'une réaction vis-à-vis des virus.

Il existe donc dans cette étude un faisceau d'hypothèses pouvant expliquer les résultats obtenus. Bien qu'il soit très difficile de trancher sur la véracité de celles-ci, des améliorations du protocole peuvent aussi être envisagées pour retenter des expériences d'infestations.

Diverses études réalisées sur la transmission de virus de type herpès chez l'huître japonaise *C. gigas* au stade larvaire (Arzul et al. 2001a-b, Le Deuff et al. 1994b) ou au stade adulte (Schikorski et al. 2011a-b) ont montré l'efficacité de l'utilisation d'un broyat d'individus infectés avec transmission horizontale. Schikorski et al. (2011a) montrent toutefois des résultats plus rapides encore chez des individus ayant subi une injection intramusculaire d'une suspension de virus que chez les individus soumis à une transmission horizontale. L'injection dans le muscle adducteur montre également de bons résultats avec l'Acute Virus Necrotoxic Virus (AVNV) chez le pétoncle *Chlamys farreri* (Xing et al. 2008), ou encore avec la bactérie *Vibrio tapetis* (agent de la maladie de l'anneau brun) chez *V. philippinarum* (Allam et al. 2006). Cependant ces expériences concernent un suivi de la mortalité des individus et non l'apparition des symptômes liés à la maladie. Une expérience d'injection directe de broyats de muscle (Dang, unpublished data) montrait des mortalités en quelques jours mais sans apparition préalable des symptômes visuels de la maladie.

Pour la maladie de l'anneau brun, un dépôt de conchioline sur la face interne de la coquille, caractéristique de la maladie, a pu être obtenu en injectant une suspension de bactéries dans la cavité palléale (Paillard 2004). Cette méthode semble donc moins invasive qu'une injection directe dans le muscle et pourrait être envisagée dans des expériences futures.

---

## Chapitre VI

# Essais de primocultures d'hémocytes et de cellules musculaires de palourde japonaise

---

*Collaboration :*

*Clothilde Heude et Kristell Kellner. CNRS INEE - FRE3484 BioMEA Biologie des Mollusques Marins et des Ecosystèmes Associés- Caen*



## 1. Introduction

Depuis plusieurs décennies, les essais de cultures cellulaires d'invertébrés marins, et notamment des mollusques bivalves, se multiplient dans le but de développer des bio-essais pour des applications dans les domaines de la physiologie, l'immunologie, les pathologies ou encore la toxicologie (Adolphe & Barlovatz-Meimon 1988, Mialhe et al. 1988, Renault 1996, Bayne 1998, Rinkevich 1999, Hauten et al. 2001, Droguet 2006). Les mollusques les plus étudiés sont naturellement les espèces à forte valeur commerciale, mais également les espèces présentant un intérêt pour la santé humaine (comme participant au cycle de vie d'un parasite humain) ou celles utilisées comme organismes modèles.

Toutefois, le faible nombre de publications impliquant des lignées cellulaires<sup>1</sup> de mollusques souligne la difficulté d'obtenir de telles cultures avec succès (Rinkevich 1999 & 2005, Yoshino et al. 2013). En effet, la lignée cellulaire embryonnaire de l'escargot *Biomphalaria glabrata* (Hansen 1976), hôte intermédiaire des parasites *Schistosoma* spp. responsables de la bilharziose, reste à l'heure actuelle la seule lignée cellulaire de mollusque existante (Yoshino et al. 2013).

Parmi les mollusques bivalves, les essais de primocultures<sup>2</sup> concernent principalement les huîtres (Le Marrecq-Croq 1995, Pennec et al. 2002 & 2004, Talarmin et al. 2008), ou les moules (Rank & Jensen 2003), les clams comme *Meretrix lusoria* (Wen et al. 1993), *Mercenaria campechiensis* (Ross Ellington 1993) et les palourdes *Venerupis decussata* (Hanana et al. 2008). Ces études sont majoritairement axées sur l'écotoxicologie et la réponse aux stress environnementaux (Domart-Coulon et al. 2000, Le Penneec & Le Penneec 2001 & 2003, Pennec et al. 2002, Hanana et al. 2008, Talarmin et al. 2008).

Dans le cadre de l'étude de la BMD et dans l'hypothèse d'un agent étiologique viral, l'obtention de primocultures de palourde japonaise répond à trois objectifs : 1) identifier des effets cytopathogènes renseignant sur la famille du virus impliqué 2) obtenir une méthode de comptage des particules virales et 3) produire en grande quantité du virus pour des essais d'infestation expérimentale (Thornton et al. 1985, Crane & Benzie 1999, Miao et al. 2000).

---

<sup>1</sup> Les lignées cellulaires sont caractérisées par leur capacité de prolifération infinie. Elles proviennent soit de tumeurs malignes soit de la transformation spontanée ou viroinduite de cultures primaires ou secondaires. Leur croissance est souvent plus rapide et leur nombre de repiquage, appelé passage, est théoriquement infini.

<sup>2</sup> Les cultures primaires, ou primocultures, sont issues de tissus normaux dont les cellules ont été dissociées mécaniquement et/ou enzymatiquement.

L'identification d'un nouvel agent viral passe très souvent par l'isolement en culture cellulaire (Goffard 2011), *e.g.* virus du syndrome respiratoire aigu sévère (Drosten et al. 2003). La culture cellulaire est une méthode relativement lente mais assez simple. Sa réussite dépend de la qualité du prélèvement, du tissu choisi, du milieu utilisé et du caractère cultivable du virus.

La Microscopie Electronique à Transmission (MET), la Polymerase Chain Reaction (PCR), la microscopie à épifluorescence ou encore la cytométrie en flux sont également des méthodes couramment utilisées dans les diagnostics viraux.

La MET reste l'une des méthodes les plus utilisées dans l'identification d'un nouveau virus. Elle permet l'accès à des informations comme la forme ou la taille, souvent indispensables à l'identification, et permet également le comptage des particules sans être contrainte par leur taille. Toutefois, il s'agit d'une méthode longue, peu reproductible (soumise à l'interprétation humaine), non routinière, nécessitant un personnel qualifié et un matériel très coûteux. L'utilisation de la PCR ou encore de tests impliquant des anticorps spécifiques nécessitent une caractérisation moléculaire du virus, et sont donc peu impliqués dans le cas de virus inconnus. La microscopie à épifluorescence, ou la cytométrie en flux permettent un comptage rapide, automatisé et exhaustif des particules. Toutefois, ces deux méthodes ne permettent pas d'identification spécifique de la particule et surtout les limites de détection basses se situant à 30-50 nm de diamètre ne sont pas compatibles avec la taille des particules observées pour la BMD (*Cf* introduction générale).

Dans le cadre de cette étude l'utilisation de la culture cellulaire présente divers avantages. Elle permet tout d'abord un diagnostic viral non orienté et ne nécessitant pas de connaissances approfondies du virus, un comptage des virus par la technique des plages de lyse mais surtout, l'isolement viral en culture cellulaire est la seule technique permettant la production de grandes quantités de virus (Goffard 2011). La constitution de stocks viraux purifiés permet ensuite d'étudier les capacités répliquatives du virus, le cycle infectieux et dans le cas de notre étude, permettrait de réaliser à nouveau des infestations expérimentales sur les palourdes en s'affranchissant des techniques longues de purification sur gradient (*Cf* chapitre V).

La présente étude regroupe une série de tests préliminaires réalisés pour l'obtention future de cultures primaires de palourdes japonaises. Deux types cellulaires choisis pour ces essais ont été les hémocytes qui présentent de faibles taux de contamination et les cellules musculaires puisqu'elles proviennent du tissu affecté par la maladie. Ces premiers essais concernent d'une part la faisabilité de telles primocultures et d'autre part des tests sur une méthode de suivi de la survie-prolifération des cellules : le WST-1.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Mise en culture des cellules

Les palourdes japonaises utilisées (longueur de coquille > 35 mm) sont issues de viviers normands où la BMD n'a jamais été observée. Avant prélèvement, les palourdes ont été maintenues 24 à 48 H en balnéation dans de l'eau de mer filtrée stérile supplémentée d'antibiotiques : streptomycine et pénicilline (concentration finale: 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et 60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivement) pour limiter les contaminations bactériennes des cultures. L'établissement de primoculture a été testé à partir d'hémocytes et de cellules musculaires dissociées :

- L'hémolymphe a été prélevée dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue stérile. Après vérification de la qualité du prélèvement au microscope optique X400 (présence d'hémocytes, absence de débris, phytoplancton,...), les hémolymphe de 10 à 15 palourdes ont été rassemblées (soit un volume d'environ 6,5 mL) puis conservées dans de la glace.

- Les cellules musculaires ont été obtenues à partir des muscles (lisses + striés) antérieurs et postérieurs (pool de 5 palourdes). Les muscles ont été rincés plusieurs fois dans de l'éthanol 70% puis de l'eau de mer stérile. Ils ont ensuite été dissociés mécaniquement aux ciseaux dans 100 mL de milieu complet supplémenté en DNaseI (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et en collagénase (2,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) pour dissocier les cellules.

*N.B : la DNaseI permet de limiter la formation d'amas d'ADN libéré par les cellules cassées qui rendraient la préparation filamenteuse et la collagénase permet d'éliminer le collagène, qui est un des constituants majeurs de la matrice extracellulaire, et donc d'obtenir des cellules isolées.*

La dissociation des cellules musculaires a été réalisée sur de la glace pendant 2 heures et sur plaque agitatrice (agitation douce). La préparation a ensuite été filtrée sur une maille de 100  $\mu\text{m}$ , puis le filtrat a été centrifugé 15 min à 250g et 15°C. Les culots ont été repris dans 1 mL de milieu complet.

Les préparations d'hémocytes et de cellules musculaires sont comptées sur cellule de Malassez puis diluées avec du milieu complet pour obtenir la quantité de cellules souhaitée.

Le milieu complet est un milieu de culture synthétique de pH = 7,4 (L15  $\rightarrow$  15,08  $\text{mg.mL}^{-1}$ ; NaCl  $\rightarrow$  20  $\text{mg.mL}^{-1}$ ; KCl  $\rightarrow$  3,67  $\text{mg.mL}^{-1}$  et Hepes  $\rightarrow$  4,765  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) supplémenté d'une solution d'antibiotiques (Concentration finale : Streptomycine  $\rightarrow$  100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Pénicilline  $\rightarrow$  60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Gentamycine  $\rightarrow$  50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Le milieu a été filtré sur une maille de 0,22  $\mu\text{m}$  avant utilisation. Les cultures cellulaires ont été incubées à 17°C.

## 2.2 Suivi de la survie-prolifération

Le suivi de la survie-prolifération des cultures cellulaires a été réalisé par une mesure spectrophotométrique de l'activité mitochondriale.

Les variations du nombre de cellules viables et actives se traduisent par une variation de l'activité mitochondriale. Le WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate, ROCHE) est transformé en formazan via cette activité (Figure VI.1a). Les variations de concentrations du formazan dans la cellule ont été estimées grâce à l'absorbance à 415 nm (Figure VI.1b). Cette absorbance est directement corrélée au nombre de cellules métaboliquement actives dans la culture.

La quantité de substrat apportée aux cellules a été variable selon nos expériences, entre 10 et 20% du volume suivant les instructions du fabricant. Les suivis ont été réalisés en plaque 24 ou 96 puits. Les conditions témoins ont été réalisées avec du milieu complet seul ou dilué avec de l'eau de mer stérile suivant le milieu dans lequel les cellules sont maintenues.

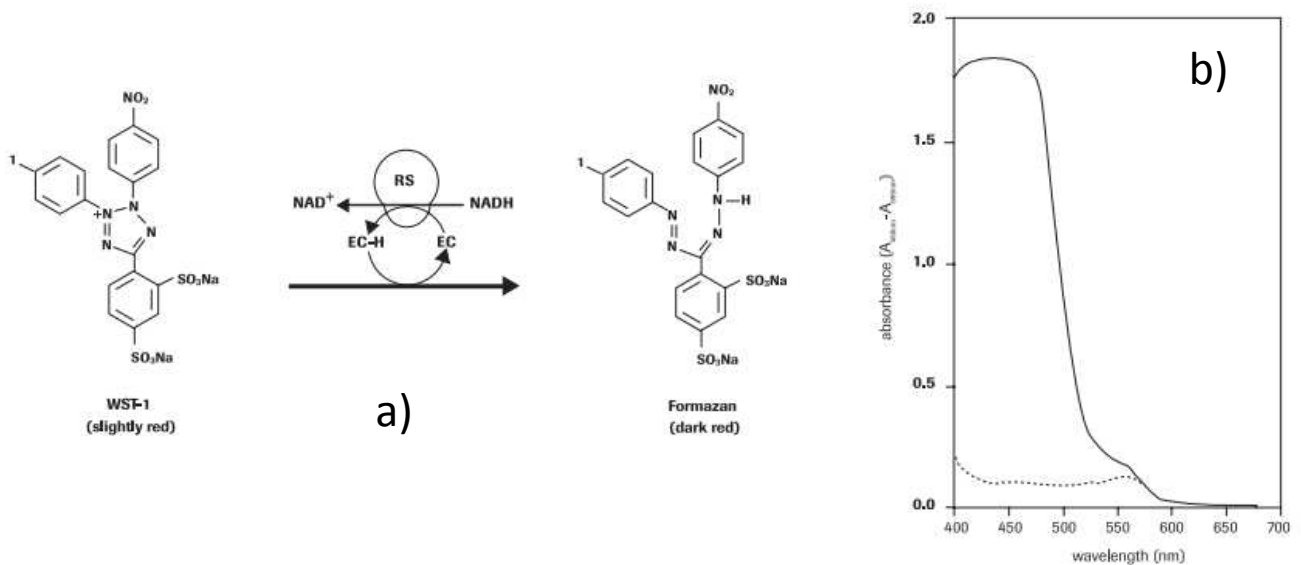


Figure VI.1. a) Clivage du WST-1 en formazan (EC = electron coupling reagent, RS = mitochondrial succinate-tetrazolium reductase system) b) spectre d'absorption du WST-1 (...) et de son produit, le formazan (—) après clivage par l'activité déshydrogénase mitochondriale. (ROCHE)

L'absorbance a été mesurée dans un volume de 100  $\mu$ L à 415 nm avec une référence à 595 nm (L'absorbance décrite = absorbance à 415 nm – absorbance à 595 nm). Le kit n'ayant pas été validé sur des cellules de bivalves, une première étape a consisté à déterminer la quantité optimale de

substrat à ajouter, puis la durée optimale d'incubation avec le WST-1. Dans cette optique, seules les primocultures d'hémocytes ont été utilisées. La durée de la réaction après ajout du WST-1 a été variable en fonction des tests réalisés. L'ensemble des tests a été réalisé en duplicat ou triplicat. Lorsque les cultures ont été réalisées en plaque 24 puits, celles-ci ont été transférées en plaque 96 puits pour la mesure d'absorbance.

### *2.3 Test 1 : Revêtement des plaques de culture cellulaire*

3 types de revêtements de plaques 24 puits ont été testés : normal en polystyrène traité (BD Falcon™), collagène (BD BioCoat™) et poly-D-lysine (BD BioCoat™).

Le revêtement collagène facilite l'adhérence, la prolifération et la croissance cellulaire. Le revêtement Poly-D-lysine est un composé synthétique qui améliore l'adhérence cellulaire.

Les deux types cellulaires ont été utilisés dans ce test comme décrit précédemment. La concentration en hémocytes était de 270 000 cellules.mL<sup>-1</sup> (ç.mL<sup>-1</sup>) et la concentration en cellules musculaires de 1 250 000 ç.mL<sup>-1</sup>

Les hémocytes ont été conservés dans un mélange hémolymphe + milieu complet (6 mL + 14 mL) et les cellules musculaires ont été maintenues dans du milieu complet.

Après 24 h d'incubation à 17°C, le milieu de culture des deux types cellulaires a été changé et remplacé par du milieu complet. Les cultures ont alors été décollées de leur support par aspiration-refoulement et transférées en plaque 96 puits. L'analyse de la survie a été réalisée aussitôt après le changement de milieu en ajoutant 10 ou 20% du volume de WST-1 (soit 10 ou 20 µL) incubé en présence des cellules pendant 2h.

### *2.4 Test 2 : Influence de la quantité de substrat et de la concentration initiale en cellules*

Ce test a été réalisé uniquement sur une culture hémocytaire en plaque 96 puits. Deux concentrations de substrat ont été testées, comme pour le test 1 : 10% et 20%. Huit concentrations cellulaires ont également été testées : de l'hémolymphe pure à 1 050 000 ç.mL<sup>-1</sup> (soit 105 000 ç.puits<sup>-1</sup>), puis des dilutions successives au ½ avec du milieu complet : 525 000 ; 262 500 ; 131 250 ; 65 620 ; 32 810 ; 16 400 et 8200 ç.mL<sup>-1</sup>. Le test a été réalisé sans incubation préalable à 17°C. La survie des cellules a été testée aussitôt après leur mise en culture et le temps d'incubation avec le WST-1 était de 2 h.

### 2.5 Test 3 : Temps d'incubation avec le WST-1

Les consignes du fabricant indiquent un temps d'incubation de 30 min à 4 h pour ce produit dans le cas de cellules animales conservées à 37°C.

Nos tests étant réalisés à 17°C pour être cohérents avec la physiologie des palourdes, une cinétique du temps d'incubation a été réalisée. Dans ce test, seule une culture hémocytaire a été suivie en plaque de 96 puits. La concentration initiale de cellules était de 1 050 000  $\text{C}.\text{mL}^{-1}$  (soit 105 000  $\text{C}.\text{puits}^{-1}$ ). Les hémocytes ont été conservés dans l'hémolymphe et il n'y a pas eu de changement de milieu. Après 48 h d'incubation à 17°C, 10  $\mu\text{L}$  de WST-1 ont été ajoutés et l'absorbance a été mesurée toutes les heures jusqu'à 8 h.

### 2.6 Test 4 : durée de survie des lignées et milieu de culture

Les hémocytes et les cellules musculaires ont été prélevés et traités comme décrit précédemment. Trois plaques 96 puits ont été réalisées : des hémocytes dans leur hémolymphe d'origine sans ajout de milieu complet; des cellules musculaires dissociées et reprises dans du milieu complet ou de l'hémolymphe (débarassée des hémocytes par centrifugation). Durant les 7 jours d'étude et pour les 3 suivis réalisés, une partie des puits n'a pas subi de renouvellement de milieu, et l'autre partie a été renouvelée avec du milieu complet après 2 ( $J_2$ ) ou 6 ( $J_6$ ) jours d'incubation.

La concentration hémocytaire était de 1 090 000  $\text{C}.\text{mL}^{-1}$  et la concentration en cellules musculaires était de 800 000  $\text{C}.\text{mL}^{-1}$  pour la culture dans le milieu complet et 1 080 000  $\text{C}.\text{mL}^{-1}$  pour la culture dans l'hémolymphe.

La survie a été testée avec 10% de WST-1 et 4 h d'incubation à  $J_0$ ,  $J_2$  et  $J_6$ , juste après l'éventuel changement de milieu.

### 2.7 Analyse statistique

L'ensemble des tests statistiques a été réalisé sous le logiciel STATISTICA 7.1 avec un seuil de significativité de 5%. La normalité des données est supposée et l'homoscédasticité a été vérifiée à l'aide du test de Cochran. Les absorbances entre les différentes conditions testées ont été comparées à l'aide d'une ANOVA.

La significativité différences entre deux pourcentages a été testée avec un test du Chi-2.

### 3. Résultats - Discussion

#### 3.1 Test 1 : Revêtement des plaques de culture cellulaire.

Lors du changement de milieu au bout de 24 h, le nombre de cellules présentes dans le milieu éliminé (le surnageant) a été estimé sur cellule de Malassez puis rapporté au nombre initial de cellules présentes dans le puits. La Figure VI.2 représente le pourcentage de cellules présentes dans le surnageant et qui se retrouvent ainsi éliminées lors du changement de milieu.

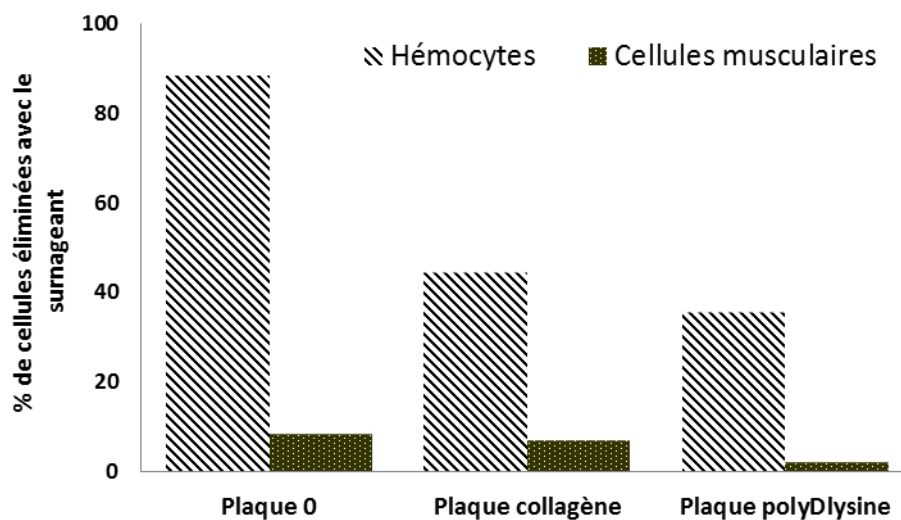


Figure VI. 2. Pourcentage de cellules présentes dans le surnageant des plaques de cultures lors du changement de milieu pour les 3 types de revêtements testés, polystyrène (plaque 0), collagène et poly-D-lysine et pour les deux lignées cellulaires suivies : hémocytes, et cellules musculaires

Pour les cellules hémocytaires, entre 40 et 88% des cellules n'adhèrent pas au support et sont donc éliminées lors du changement de milieu. Pour les cellules musculaires, le pourcentage de perte est bien moins important et ne dépasse pas 9%. Dans les 3 types de revêtements, les cellules musculaires adhèrent mieux que les cellules hémocytaires (Chi-2 ;  $p < 0,001$ )

Pour les deux types cellulaires, la plaque sans revêtement spécifique (plaque 0) est celle qui présente la moins bonne adhérence, alors que la plaque poly-D-lysine présente la meilleure adhérence (Chi-2 ;  $p < 0,001$ ).

L'analyse de la survie-prolifération sur les 3 types de plaques et les deux types cellulaires montre des résultats d'absorbance assez faibles avec un maximum à 0,05 (Figure VI.3). L'analyse

statistique (ANOVA multifactorielle) montre une influence du type cellulaire avec une absorbance plus élevée pour les cellules musculaires ( $F = 54,98$  ;  $p < 0,001$ ).

Une quantité plus importante de WST-1 n'influence pas l'absorbance ( $F = 3,89$  ;  $p = 0,060$ ) et on ne constate un "effet plaque" que dans le cas des cellules musculaires incubées avec 20  $\mu\text{L}$  (= 20% du volume) de WST-1, où l'absorbance est plus importante pour la plaque 0 que pour les plaques avec un revêtement spécial.

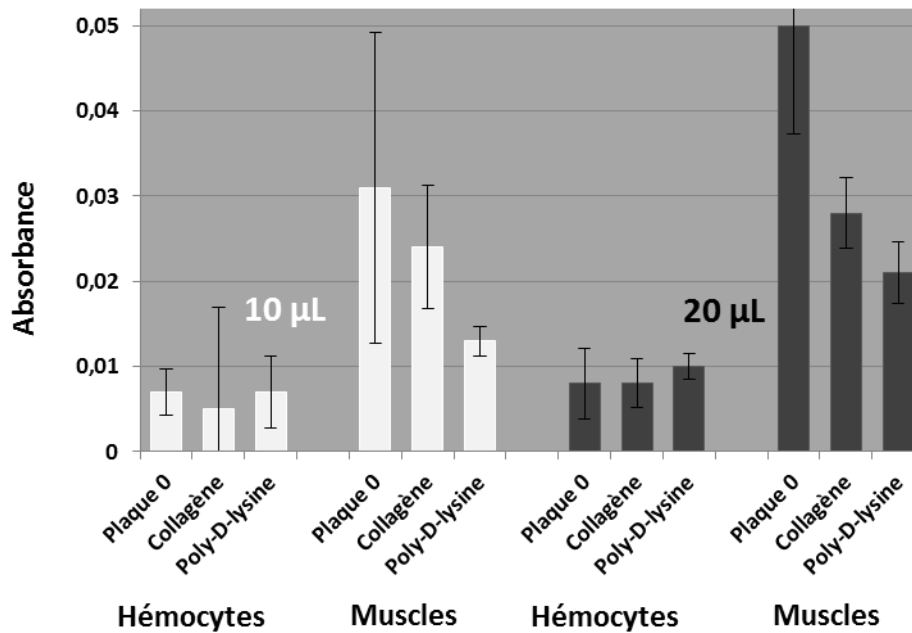


Figure VI.3. Mesure d'absorbance (moyenne  $\pm$  écart-type) pour le suivi de la survie / prolifération de deux types cellulaires : les hémocytes et les cellules musculaires (Muscles). Ces mesures sont réalisées avec deux quantités de substrat, 10 (histogramme blanc) ou 20  $\mu\text{L}$  (histogramme noir) soit 10 ou 20% du volume du puits, et pour 3 types de revêtements de plaques de culture : standard en polystyrène (plaque 0), collagène ou poly-D-lysine

Le test montre une meilleure adhésion avec un revêtement en poly-D-lysine, par rapport à un revêtement collagène. Les plaques standard en polystyrène montrent les moins bons taux d'adhésion. Les cellules musculaires présentent des taux d'adhérence supérieurs à 90% alors que ceux des hémocytes ne dépassent pas 60% et descendent même jusqu'à 12% seulement pour les plaques standards.

L'absorbance plus faible pour les hémocytes, qui traduit un nombre de cellules actives plus faible, s'explique en grande partie par la concentration initiale en cellules dans les puits qui était plus faible (270 000  $\text{cell.mL}^{-1}$  contre 1 250 000  $\text{cell.mL}^{-1}$  pour les cellules musculaires) à laquelle s'ajoutent les lourdes pertes cellulaires au moment du changement de milieu. Malgré des niveaux



d'adhérence significativement différents entre les trois types de support, au sein de chaque type cellulaire, l'absorbance est identique entre les trois types de support sauf pour les cellules musculaires incubées avec 20  $\mu\text{L}$  de WST-1 où est observée étonnamment une plus forte absorbance pour la plaque avec un revêtement standard.

L'absorbance étant le reflet du nombre de cellules actives, le résultat attendu serait une absorbance positivement corrélée aux capacités d'adhérence des cellules et donc au nombre de cellules présentes dans la plaque, ce qui n'est pas le cas.

Pour les mesures d'absorbance, les cellules sont décollées des plaques 24 puits par aspiration-refoulement et transférées en plaque 96 puits. Cela suggère que dans les plaques avec une forte adhérence (poly-D-lysine; collagène), les cellules sont plus difficiles à décoller et donc à transférer en plaque 96 puits pour les mesures d'absorbance. Le volume de WST-1 ajouté lors de la réaction n'influençant pas l'absorbance mesurée, la quantité de 10  $\mu\text{L}$  (soit 10% du volume du puits) semble suffisante pour que la réaction soit complète avec ces concentrations cellulaires.

L'utilisation de plaques 24 puits avec un revêtement spécial semble être une bonne option pour maintenir des cultures importantes et permettre des changements de milieu en limitant les pertes cellulaires. Toutefois, la difficulté à transférer les cellules dans les plaques 96 puits limite l'utilisation de ces plaques 24 puits avec cette méthode d'estimation de la survie-prolifération.

### 3.2 Test 2 : Influence de la quantité de substrat et de la concentration initiale en cellule

Pour une concentration cellulaire de 105 000  $\text{cellules}\cdot\text{puits}^{-1}$  soit 1 050 000  $\text{cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$ , l'absorbance atteint des valeurs proches de 0,1. Cette valeur descend à 0,045 pour une concentration deux fois moins importante (Figure VI.4).

Une décroissance significative est notée pour les premières dilutions cellulaires ( $F = 1629$  ;  $p < 0,001$ ). En deçà d'un nombre de cellules de l'ordre de 262 500  $\text{cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$  l'absorbance n'est plus fonction de la concentration cellulaire. En effet, les différentes concentrations cellulaires montrent des niveaux d'absorbance équivalents.

L'ANOVA met également en évidence un effet de la concentration en substrat avec une meilleure absorbance pour les cultures incubées avec 20  $\mu\text{L}$  de WST-1. Ces différences sont significatives pour trois concentrations cellulaires. Cette différence n'est pas visible pour les très faibles concentrations cellulaires, ni pour la plus forte concentration (Figure VI.4).

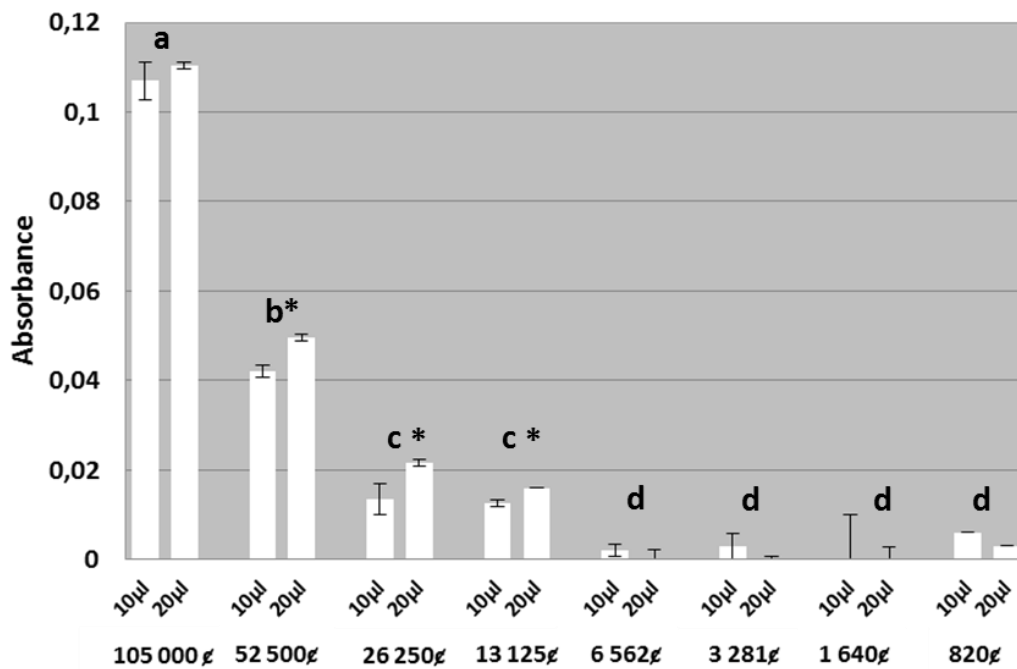


Figure VI.4. Comparaison d'absorbance (moyenne  $\pm$  écart-type) pour différentes concentrations cellulaires (hémocytes) et pour 2 concentrations en substrat. Les nombres de cellules notés correspondent à la quantité de cellules dans un puits de 100  $\mu\text{L}$  déterminé en fonction de la concentration cellulaire de la suspension (105 000  $\phi$  par puits pour une suspension à 1 050 000  $\phi.\text{mL}^{-1}$ ). Chaque lettre indique un niveau d'absorbance significativement différent pour une concentration cellulaire (sans tenir compte de la quantité de substrat) et "\*" indique une différence significative ( $p < 0,05$ ) de l'absorbance pour une même concentration cellulaire mais avec un volume de substrat différent

Ces résultats valident l'utilisation du WST-1 comme bon indicateur de la quantité de cellules actives présentes dans la culture. Toutefois, en deçà d'une certaine concentration cellulaire ( $\approx 260\,000\ \phi.\text{mL}^{-1}$ ), les absorbances sont trop faibles et ne sont plus proportionnelles à la quantité de cellules présentes dans la culture. Il est donc nécessaire d'utiliser des cultures cellulaires suffisamment concentrées.

La quantité de WST-1 utilisée n'influence pas fortement l'absorbance mesurée. Il y a rarement de différence significative pour toutes les concentrations cellulaires, et lorsque celle-ci existe, elle représente une augmentation de l'absorbance de seulement quelques pourcents. Une quantité de substrat de 10  $\mu\text{L}$  ne semble donc pas limitante pour une culture cellulaire de l'ordre de 1 000 000  $\phi.\text{mL}^{-1}$ . Les cultures cellulaires réalisées excédant rarement cette concentration, l'ensemble des tests suivant sera réalisé avec 10  $\mu\text{L}$  de WST-1.

3.3 Test 3 : Temps d'incubation avec le WST-1

La cinétique d'apparition du formazan, produit du clivage du WST-1 par la chaîne mitochondriale montre une augmentation au cours des 8 h de suivi (Figure VI.5). Après 1 h d'incubation avec le WST-1, l'absorbance est de 0,12 et elle augmente jusqu'à 0,22 après 8 h.

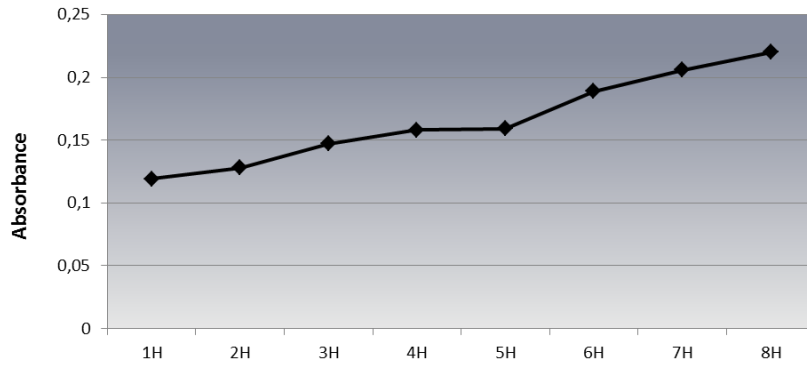


Figure VI.5. Cinétique de l'apparition du formazan dans le milieu de culture

Des résultats similaires sont obtenus lors du test 2 où une seconde mesure d'absorbance a été réalisée après 7 h d'incubation (Figure VI.6). L'absorbance est plus élevée après 7 h d'incubation qu'après 2 h (ANOVA,  $F = 873$  ;  $p < 0,001$ ). Cette différence significative est observée pour les concentrations cellulaires les plus élevées. Les mêmes différences sont observées pour l'utilisation de 20  $\mu\text{L}$  de WST-1.

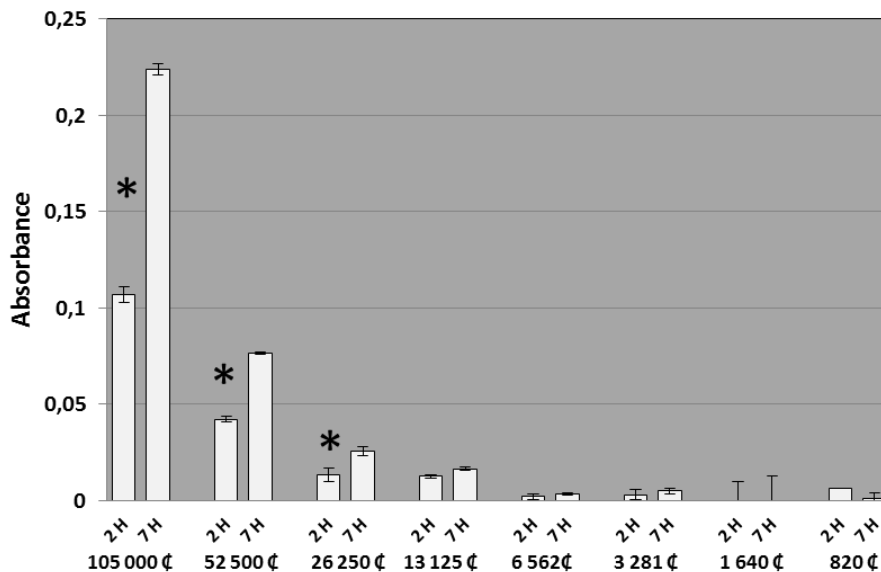


Figure VI.6. Comparaison de deux temps d'incubation avec le substrat WST-1: 2 heures et 7 heures pour différentes concentrations cellulaires. Les quantités de cellules notées correspondent à la quantité dans un puits de 100  $\mu\text{L}$  (105 000  $\phi = 1\,050\,000 \phi \cdot \text{mL}^{-1}$ ). "\*" indique une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre deux temps d'incubation pour une même concentration cellulaire

Le bruit de fond, lié à l'absorbance des cellules seules et du milieu de culture, est relativement élevé dans ces tests. Il est donc important d'obtenir des absorbances suffisamment fortes pour pouvoir les détecter après extraction du bruit de fond. L'utilisation d'un temps d'incubation plus long que les recommandations du fabricant est donc préconisée.

### 3.4 Test 4 : durée de survie des lignées et milieu de culture

Les lignées cellulaires présentent des survies différentes selon le milieu de culture utilisé. Pour la culture hémocytaire, l'absorbance augmente significativement après 6 jours ( $J_6$ ) d'incubation sans renouvellement du milieu de culture de base (l'hémolymphe) (Tableau VI.1). Toutefois, lorsque le milieu de culture est renouvelé à  $J_2$  et  $J_6$  avec le milieu complet, une décroissance significative de l'absorbance est observée au bout de 6 jours.

Tableau VI.1. Absorbance moyenne ( $\pm$  écart-type) des différentes lignées cellulaires testées : hémocytes dans de l'hémolymphe, cellules musculaires dans de l'hémolymphe et cellules musculaires dans du milieu complet. Les mesures sont réalisées le jour de la mise en culture ( $J_0$ ), après 2 jours ( $J_2$ ) et après 6 jours ( $J_6$ ). Les résultats de l'ANOVA sont donnés pour chaque groupe :  $F$  = variance inter-groupe / variance intra-groupe et  $p$  =  $p$ -value. Pour une même culture, Les lettres déterminent un niveau d'absorbance significativement différent entre deux valeurs ( $p < 0,05$ )

	HEMOCYTES			CELLULES MUSCULAIRES DANS HEMOLYMPHE			CELLULES MUSCULAIRES DANS MILIEU COMPLET		
	$J_0$	$J_2$	$J_6$	$J_0$	$J_2$	$J_6$	$J_0$	$J_2$	$J_6$
Sans changement de milieu	0,11 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>	0,013 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a,b</sup>	0,03 <sup>c</sup>
	$\pm 0,008$	$\pm 0,066$	$\pm 0,062$	$\pm 0,003$	$\pm 0,11$	$\pm 0,089$	$\pm 0,005$	$\pm 0,004$	$\pm 0,005$
	F = 65,22 ; $p < 0,001$			F = 8,32 ; $p = 0,020$			F = 11,7 ; $p = 0,008$		
Avec Changement de milieu	0,11 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a,b</sup>	0,033 <sup>b</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,8 <sup>b</sup>	2,42 <sup>c</sup>	0,013	0,023	0,021
	$\pm 0,008$	$\pm 0,042$	$\pm 0,014$	$\pm 0,003$	$\pm 0,53$	$\pm 0,25$	$\pm 0,005$	$\pm 0,005$	$\pm 0,03$
	F = 6,42 ; $p = 0,030$			F = 96,95 ; $p < 0,001$			F = 0,32 ; $p = 0,740$		

Pour les cellules musculaires, deux types de milieux initiaux ont été testés, le milieu complet pur, mais également de l'hémolymphe débarrassée de ses hémocytes.

A  $J_0$ , l'absorbance est plus élevée pour les cellules maintenues dans l'hémolymphe que pour celles maintenues dans le milieu complet ( $F = 324$  ;  $p < 0,001$ ). Cette différence s'explique par la

concentration initiale en cellules dans le puits qui était plus faible pour la culture dans le milieu complet.

Les cellules musculaires cultivées dans le milieu complet montrent des valeurs d'absorbance très basses tout au long du suivi, qu'il y ait ou non changement du milieu. Ces valeurs n'excèdent pas 0,03 et le changement de milieu n'influence pas l'absorbance, et donc la survie-prolifération des cellules à J<sub>2</sub> (F = 1,12 ; p = 0,35) comme à J<sub>6</sub> (F = 0,29 ; p = 0,62).

Les cellules musculaires mises en culture dans de l'hémolymphe montrent tout au long du suivi des valeurs plus élevées que les cellules cultivées dans le milieu complet.

Une forte différence d'absorbance entre les cultures maintenues dans le milieu initial et celles dont le milieu est renouvelé (avec du milieu complet) à J<sub>2</sub> et J<sub>6</sub> est toutefois notée. Pour les cellules dont le milieu n'est pas renouvelé, l'absorbance augmente à J<sub>2</sub> puis reste stable jusqu'à J<sub>6</sub> avec des valeurs proches de 0,3. Les cultures cellulaires dont le milieu est renouvelé présentent une augmentation à J<sub>2</sub> et également à J<sub>6</sub>. La survie-prolifération des cellules est meilleure dans un milieu renouvelé à J<sub>2</sub> (F = 18,90 ; p = 0,012) comme à J<sub>6</sub> (F = 190 ; p < 0,001).

Ce dernier test indique des préférences différents pour les deux types de cultures cellulaires. Alors que les hémocytes ont une meilleure survie/prolifération dans un milieu non renouvelé, le changement de milieu influence positivement les cultures de cellules musculaires. En se reportant au test 1, les faibles absorbances observées pour les hémocytes peuvent toutefois être imputées à une perte des cellules lors du changement de milieu.

Des observations en microscopie inversée des cultures de cellules musculaires dans du milieu complet montrent de grandes quantités de débris et de bactéries. Ces contaminations peuvent expliquer les très faibles taux d'absorbance mesurés pour cette série de cultures. Pour les cellules musculaires, le changement de milieu est favorable au développement de la culture.

#### 4. Conclusion - Perspectives

Watson et al. (1987) détermine l'ancrage comme un facteur nécessaire à la division de nombreux types cellulaires. Il est donc nécessaire de favoriser l'adhérence des cellules pour permettre leur division mais également pour limiter les pertes lors des changements de milieu. Le revêtement poly-D-lysine présente un avantage certain quant à l'adhérence des cellules, comme déjà évoqué par Renault et al. (1995) sur des cultures d'huîtres plates *Ostrea edulis*. D'autres auteurs comme Lebel et al. (1996) utilisent de la concanavalin A (hémagglutinine) pour favoriser l'adhérence. Des cultures réalisées directement en plaque 96 puits avec revêtement poly-D-lysine limiteraient les pertes liées au transfert entre plaques pour les analyses en spectrophotométrie. L'adhérence pourrait également être favorisée par un temps d'incubation plus long avant les tests. En effet, des travaux réalisés chez *Venerupis decussata* montre un minimum d'incubation de 48 h pour que les cellules commencent à adhérer (Hanana et al. 2008).

Depuis ces dernières années, le WST-1 est de plus en plus utilisé pour les suivis de culture cellulaire ([www.dojindo.com](http://www.dojindo.com)). Ce produit est un analogue du MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) qui caractérise également l'activité métabolique des cellules par spectrophotométrie et qui était jusqu'alors fréquemment utilisé (Lebel et al. 1996, Domart-Coulon et al. 2000, Hanana et al. 2008). Le WST-1 offre des résultats similaires à ceux obtenus avec le MTT ( $R^2 = 0,93$ . Ngamwongsatit et al. 2008) et présente de nombreux avantages comme l'absence d'une étape de solubilisation, une toxicité moindre pour les cellules et une meilleure stabilité de stockage (Panjian et al. 2005, Ngamwongsatit et al. 2008). Dans le cadre de nos expériences, une quantité correspondant à 10% du volume du puits et un temps d'incubation de 4 à 7 h semblent optimaux.

Toutefois, l'utilisation de telles méthodes de spectrophotométrie (MTT ou WST-1) nécessite des concentrations cellulaires de l'ordre de  $1\ 000\ 000\ \text{ç.mL}^{-1}$  pour pouvoir détecter l'absorbance liée aux cellules. Chez la palourde européenne *V. decussata*, des concentrations similaires ont également été évoquées pour des analyses avec du MTT (Domart-Coulon et al. 2000).

La majorité des cultures cellulaires d'invertébrés marins s'appuie sur l'emploi de milieux synthétiques complexes créés pour les vertébrés et dont l'osmolarité est ajustée par addition de NaCl. Parmi ces milieux synthétiques, le L15 est de plus en plus utilisé pour les cultures de bivalves (Domart-Coulon et al. 1994, Le Deuff et al. 1994a, Takeuchi et al. 1994a-b, Renault et al. 1995, Odintsova et al. 1999 & 2000). Ce milieu est généralement préféré, car tamponné par un tampon

organique (Le Marrecq-Croq 1995, Kasornchandra et al. 1999), pour sa forte teneur en acides aminés (Odintsova & Khomenko 1991, Wen et al. 1993a-b, Shimizu et al 2001), et également pour ses glucides analogues à ceux présents naturellement dans l'hémolymphe des bivalves (Coulon 1993).

Au vu de nos résultats, il est difficile de conclure sur le choix du milieu à utiliser pour ces cultures. Une culture dans de l'hémolymphe pure sans changement de milieu est plus favorable pour les hémocytes, bien qu'il soit difficile d'être affirmatif au vu des grosses pertes cellulaires au moment des changements de milieux. Pour les cellules musculaires, un début de culture dans de l'hémolymphe suivi par des changements de milieux avec du L15 semblent favorables à la survie-prolifération. Cependant, la contamination de la culture dans le milieu complet ne nous permet pas de savoir quel type de milieu d'origine préférer pour une telle culture.

Avant l'avènement des milieux synthétiques pour la culture de cellules de bivalves, des milieux dont la composition était basée sur celle de l'hémolymphe étaient utilisés (Cousserans 1975 & 1979, Mialhe et al. 1988). D'autres études comme celle de Renault et al. (1995) sur des cellules de cœur d'huître plate *Ostrea edulis* montrent les meilleurs résultats pour un mélange milieu synthétique/hémolymphe de l'hôte.

La réussite d'une culture cellulaire dépend certes des conditions de culture mais également des capacités de survie des cellules, des contaminations par des micro-organismes et des dommages éventuels liés à la dissociation tissulaire.

Dans le cadre de cette étude, deux types cellulaires ont été choisis : les cellules musculaires et les hémocytes. Les problèmes rencontrés lors de cultures cellulaires sont souvent le fait de contamination (Robledo & Caraville 1997, Bayne 1998, Birmellin et al. 1999, Chen & Wen 1999, Rinkevich 1999). Pour les cellules musculaires, de nombreuses bactéries, champignons et autres débris cellulaires ont souvent été observés dans les cultures. Pour limiter les dommages liés à la dissociation cellulaire, des essais de culture à partir d'explant ont également été réalisés. Mais là encore, les cultures cellulaires présentaient de fortes contaminations par divers débris et micro-organismes.

L'avantage de l'hémolymphe est qu'elle est relativement aseptisée (Yoshino et al. 2013), et permet donc de s'affranchir de ces problèmes de contaminations. Toutefois, les hémocytes sont des cellules fortement différenciées (Yoshino et al. 2013). De ce fait, leur temps de survie *in vitro* est relativement court et probablement non compatible pour une production virale.

Tout au long de ce chapitre, l'absorbance a été corrélée à une « survie-prolifération » des cellules. Toutefois, il nous est impossible de différencier ces deux paramètres. L'augmentation de l'absorbance pourrait être le fait soit de cellules déjà présentes mais qui recommencent seulement à être actives après un certains temps de latence, soit de nouvelles cellules. Il serait d'une part intéressant de réaliser une gamme étalon pour connaître la correspondance exacte entre absorbance mesurée et nombre de cellules actives dans les conditions de culture choisies, et d'autre part de compléter cette analyse pour différencier les nouvelles cellules. La méthode de prolifération Brdu (Bromodéoxyuridine) est une alternative intéressante. Cette molécule remplace la thymidine au moment de la mitose. Grâce à un anticorps anti Brdu couplé à un fluorochrome, le brin d'ADN nouvellement synthétisé peut être suivi et confirme la prolifération cellulaire.

Au vue des freins rencontrés durant cette étude et de nos objectifs (production virale et effets cytopathogènes), il serait intéressant de tester des primocultures présentant une durée de vie plus longue et un faible taux de contamination. De nombreux essais sur des cellules cardiaques ont été réalisés notamment chez les huîtres (Coulon 1993, Wen et al. 1993b, Domart-Coulon et al. 1994, Le Deuff et al. 1994a, Renault et al. 1995, Boulo et al. 1996, Buchanan et al. 1999, Chen & Wen 1999, Domart-Coulon et al. 2000, Pennec et al. 2002). En effet, cet organe étant protégé par la membrane péricardique, il n'est pas en contact direct avec l'eau intervalvaire et peut être prélevé aseptiquement. De plus, ces cultures ont une durée de vie qui peut aller jusqu'à plusieurs mois (Coulon 1993, Chen & Wen 1999, Itami et al. 1999, Owens & Smith 1999, Miao et al. 2000).





---

## Chapitre VII

# Impact de la BMD sur la palourde japonaise et recherche de l'agent causal: approche de transcriptomique comparative

---

*Collaborations :*

*Emilie Merour et Michel Brémont. Unité de recherche Virologie et Immunologie Moléculaires – INRA Jouy-en-Josas*

*Fabien Pierron. Unité Ecotoxicologie Aquatique – UMR 5805 EPOC Université Bordeaux 1/CNRS*

*Plateforme Génome et Transcriptome (GeT) - Toulouse*

## 1. Introduction

Définies comme méthode de l'année en 2007 par Nature Methods (Editorial, volume 5), les nouvelles techniques de séquençage ou NGS (Next-generation sequencing), méthodes de séquençage haut-débit dites de 2<sup>nde</sup> génération, s'inscrivent depuis comme des techniques incontournables dans l'étude des organismes modèles (Ossowski et al. 2008, Hillier et al. 2009, Daines et al. 2009, Smith et al. 2008, Bentley et al. 2008, Li et al. 2010, Mortazavi et al. 2008, Sultan et al. 2008, Wang et al. 2008) et non modèles (Buggs et al. 2010, Chen et al. 2010, Feldmeyer et al. 2011, Wang et al. 2010a,b, Mizrachi et al. 2010, Garg et al. 2011). Le nombre de revues consacrées à ce sujet (Mardis 2008, Schuster 2008, Shendure & Ji 2008, Ansorgue 2009, Metzker 2010, Richardson 2010, Tautz et al. 2010, Zhang et al. 2011, Liu et al. 2012) ainsi que les nombreuses publications annuelles utilisant ces techniques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) témoignent de l'engouement de la communauté scientifique pour les NGS.

Trois plateformes se partagent le monopole du séquençage haut-débit : Roche/454 FLX ([www.454.com](http://www.454.com)), Illumina/Solexa Genome Analyser ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)) et Applied Biosystems SOLID™ system ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) rejointes petit à petit par de nouvelles plateformes techniques de 3<sup>ième</sup> génération (Schadt et al. 2010).

L'intérêt des NGS réside dans l'automatisation des appareillages, dans la diminution du coût et du temps de séquençage par rapport à la méthode de première génération, dite méthode de Sanger (Sanger et al. 1977), et dans un champ d'application très étendu. De grands domaines sont couverts par les NGS comme le séquençage *de novo*, la métagénomique, le re-séquençage et les analyses fonctionnelles.

- Le séquençage *de novo* permet de fournir la séquence d'un génome inconnu. Il est tout particulièrement utilisé dans l'étude d'anciens génomes comme celui de l'ours des cavernes (Noonan et al. 2005), du mammoth (Poinar et al. 2006) ou de l'homme de Neandertal (Green et al. 2006, Noonan et al. 2006) mais également dans la découverte d'agents pathogènes ou de nouveaux virus (Gaynor et al. 2007).

- La métagénomique vise à étudier l'ensemble des génomes issus d'un même milieu ainsi que les interactions entre ces génomes. Cette technique est particulièrement utilisée dans le domaine de l'écologie pour associer une fonction biologique à un habitat (Kennedy et al. 2010, Desai et al. 2012)

- Le re-séquençage permet de comparer une séquence observée à une séquence de référence. Cette application est particulièrement utilisée dans le domaine médical pour étudier le polymorphisme et les mutations et ainsi détecter des variants associés à des maladies génétiques (Cirulli & Goldstein 2010, Ng et al. 2010).

- Les analyses fonctionnelles sont diverses et permettent par exemple de quantifier l'expression des gènes (Anders & Huber 2010, Robinson et al. 2010), de déterminer la quantité et le type d'ARN présent dans une cellule (Ozsolak & Milos 2011), d'analyser la régulation des phénomènes de transcription à travers les longs ARN non codants et les petits ARN (Ingolia et al. 2009), de déterminer les régions de l'ADN où se fixent les facteurs de transcription (Park 2009), d'étudier les modifications épigénétiques d'un génome en cartographiant ses sites de méthylation (Laird 2010) ou encore de caractériser et cribler des biomarqueurs (Schwarzenbach et al. 2011).

Dans le domaine de l'identification d'agents pathogènes viraux, plusieurs revues soulignent l'intérêt des NGS (Hall 2007, Cheval et al. 2011, Liu et al. 2011, Radford et al. 2012, Martson et al. 2013). Jusqu'alors, la microscopie électronique à transmission et les techniques de caractérisation moléculaire par clonage bactérien demeuraient les seules méthodes d'identification de nouveaux virus dans un échantillon biologique (Goldsmith & Miller 2009, Tang & Chiu 2010). La méthode de séquençage souffrait de deux contraintes majeures liées à l'isolement du virus sur lignée cellulaire et de certains prérequis sur la séquence virale. En effet, certains virus ne sont pas cultivables et les lignées cellulaires ne sont pas toujours disponibles (comme c'est le cas pour les mollusques bivalves- Cf chapitre VI), et l'identification moléculaire est souvent basée sur des techniques qui nécessitent de connaître le virus ou la famille à laquelle il appartient pour utiliser des amorces adaptées. Les NGS ne nécessitant pas d'amplification préalable ni de séquences spécifiques complémentaires, la probabilité de réussite du séquençage est forte (Radford et al. 2012)

Dans le cadre de l'étude de l'agent étiologique de la BMD, l'échec des méthodes "classiques" d'identification moléculaire des particules virales (Chapitre IV) nous a amené à considérer l'utilisation du séquençage haut-débit. L'approche privilégiée est une approche de transcriptomique comparative entre muscles sains et muscles malades. Cette approche répond à deux objectifs: i) pouvoir identifier des gènes induits ou réprimés par l'organisme hôte en réponse à la maladie comme déjà réalisé pour d'autres pathologies d'origine virale (Wang et al. 2005, Xu et al. 2012) et ii) de pouvoir identifier des séquences virales nous permettant de renseigner la famille mise en cause. La méthode de séquençage choisie est la méthode Illumina dont le principe est décrit dans le paragraphe 2.4.1.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Matériel biologique

Deux lots de palourdes japonaises ont été échantillonnés sur un site interne du bassin d'Arcachon (44°41'N, 1°04'W). Deux lots de palourdes japonaises ont été récoltés à l'automne 2012. Un premier lot de 3 palourdes malades de Muscle Print Index = 3 (longueur de coquille = 32 mm) et un second lot de 2 palourdes saines (30 mm). Les palourdes malades ont été échantillonnées à la surface du sédiment où la prévalence de la maladie est plus importante (Dang et al. 2008) et les palourdes saines en position enfouie. La présence et l'intensité de la maladie ont été déterminées macroscopiquement (Cf Introduction générale).

### 2.2 Extraction ARN

Pour chaque lot, environ 40 mg de muscle adducteur postérieur ont été prélevés. Les tissus ont été broyés avec des billes de céramique ( $\varnothing$  1,4 mm) et 500  $\mu$ L de trizol pendant 40 s au Fastprep (MP Biomedicals). L'ajout de phénol-chloroforme-alcool isoamylique 25:24:1 (400  $\mu$ L) permet la récupération de la phase aqueuse contenant les acides nucléiques. Cette phase a ensuite été purifiée avec le kit RNeasy (QIAGEN) suivant les instructions du fabricant. Les ARNs extraits ont été conservés séparément à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du tampon d'élution. La qualité des ARN a été évaluée au Nanodrop (Thermo SCIENTIFIC) et au bioanalyseur (Agilent).

### 2.3 Préparation librairie d'ARN

Les deux librairies (muscle sain + muscle malade) ont été préparées avec le kit TruSeq RNA sample preparation v2 (ILLUMINA) suivant les instructions du fabricant. Les ARN messagers (ARNm) ont été purifiés à l'aide de billes polyT puis fragmentés chimiquement en fragments de 155 pb environ. Des Random Hexamer-primers (séquences de 6 oligonucléotides aléatoires) ont été utilisés pour synthétiser le 1<sup>er</sup> brin d'ADN complémentaire (ADNc) puis le second. A chaque étape du protocole, une étape supplémentaire de purification a été réalisée pour éliminer les produits restant. Les extrémités des fragments obtenus ont ensuite été réparées par phosphorylation puis adénylées pour permettre la fixation orientée des adaptateurs.

Ces derniers sont composés d'une séquence complémentaire pour fixer la librairie sur la cellule utilisée lors du séquençage : la flowcell, des primers pour le séquençage et également un index spécifique de l'échantillon concerné : muscle sain ou muscle malade.

## 2.4 Séquençage

### 2.4.1 Principe de la méthode Illumina

La méthode Illumina Genome Analyser est basée sur l'incorporation réversible de nucléotide fluorescent (CRT : cyclic reversible termination) et par lecture optique de la fluorescence. La méthode, développée par l'équipe de Turcatti (Fedurco et al. 2006, Turcatti et al. 2008) et commercialisée par Solexa en 2006, a été rachetée par la société Illumina en 2007.

Le principe du séquençage par la méthode Illumina Genome Analyzer est présenté en Figure VII.1. L'ADN à séquencer est coupé en petits fragments de quelques centaines de paires de bases puis ligué à des adaptateurs (a). L'ensemble des fragments d'ADN + adaptateurs est appelé "bibliothèque". Cette dernière est déposée et fixée sur une surface de verre appelée flow-cell recouverte de séquences complémentaires aux adaptateurs (b). A partir du brin fixé, un nouveau brin va être synthétisé par une polymérase. La séquence présente sur la flow-cell va servir d'amorce à la polymérase pour synthétiser le brin complémentaire au brin fixé. Le brin néo-synthétisé est alors lié de façon covalente à la flow-cell et le brin d'origine est éliminé par dénaturation. L'extrémité libre du brin néo-synthétisé va aller s'hybrider à une séquence complémentaire sur la flow-cell et former un pont (c). La polymérase synthétise à nouveau le brin complémentaire pour former un pont d'ADN double brin, puis les deux copies sont libérées par dénaturation (d). Chacune des extrémités libres va à nouveau s'hybrider avec une séquence complémentaire de la flow-cell pour former un pont. Ce cycle d'amplification en pont est répété jusqu'à obtenir un regroupement d'environ 1000 clones d'ADN appelé cluster ou colonie. Les brins anti-sens, correspondant à la première séquence à l'origine du cluster, sont clivés. L'extrémité 3' des fragments d'ADN est bloquée et l'amorce pour le séquençage s'hybride. Le séquençage est effectué avec des déoxyribonucléotides présentant une double particularité (e). Ces derniers sont associés à une molécule fluorescente et possèdent un groupement 3' bloquant l'action de la polymérase pouvant être tout deux chimiquement clivés. A chaque étape, une seule base est ainsi incorporée par la polymérase grâce au groupement 3'. La fluorescence émise est détectée et identifiée (chaque nucléotide émet une fluorescence différente) par une caméra (f). Après chaque étape, le groupement 3' et la molécule fluorescente sont clivés chimiquement et le cycle de synthèse recommence. La lecture du fragment va pouvoir être réalisée à partir des images récupérées à chaque cycle (g). Environ 100 pb sont lues pour chaque fragment. Les séquences de plusieurs millions de colonies sont lues simultanément.

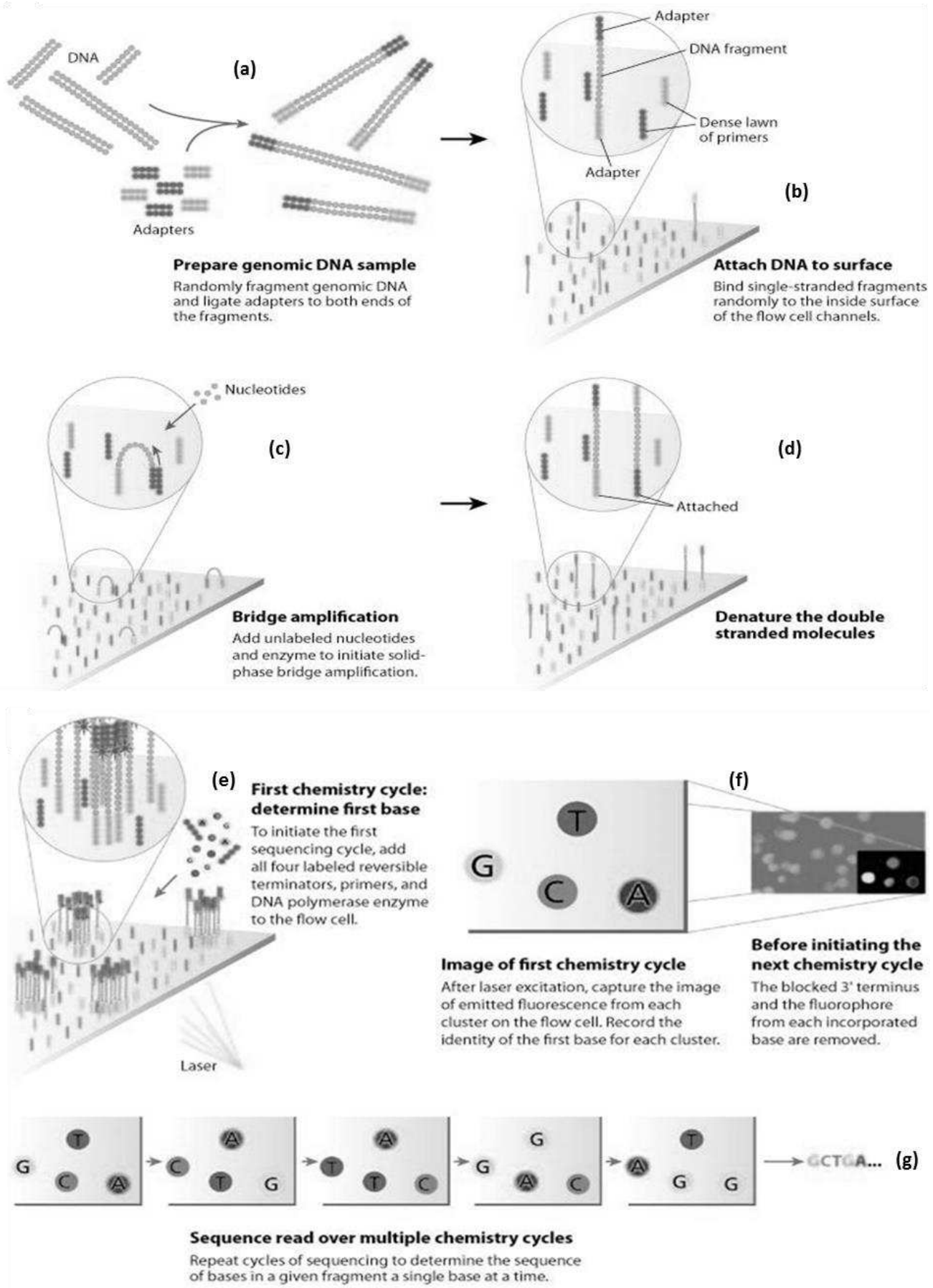


Figure VII.1. Principe de la méthode illumina (Mardis 2008)

Dans le cas de notre étude, la méthode Pair-End a été utilisée. Après une première lecture des polonies, une nouvelle hybridation en pont a été réalisée. Le brin nouvellement synthétisé sert de matrice pour le séquençage. La séquence double brin a ainsi été séquencée des deux côtés comme décrit dans la figure VII.2



Figure VII.2. Principe du séquençage Pair-End

#### 2.4.2 Dépôt des librairies sur la flowcell

Le séquençage a été réalisé sur l'HiSeq 2000 à la plateforme Génome et Transcriptome (GeT) de Toulouse (Genotoul). Les librairies ont été déposées sur la flowcell à l'aide des kits TruSeq PE v3 (ILLUMINA) et le séquençage a été réalisé avec les kits TruSeq SBS v3 (ILLUMINA) suivant les instructions du fabricant. Les deux librairies ont été chargées sur la même flowcell (mais différenciables grâce à l'index présent dans les adaptateurs).

La méthode de séquençage utilisée a été la méthode Pair-end (Figure VII.2). Cent bases sont lues de chaque côté du fragment.

#### 2.5 Assemblage et analyse des données

Les données de séquençage ont été conservées et traitées dans l'environnement ng6 (Mariette et al. 2012). La qualité des séquences a été vérifiée à l'aide des programmes Burrows-Wheeler Aligner (Li & Durbin 2009) et fastQC ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)). L'assemblage *de novo* du transcriptome a été réalisé à l'aide du programme Oases (Schulz et al. 2012) et de l'algorithme Velvet (Zerbino & Birney 2008). Les chimères (contigs regroupant plusieurs gènes) et les transcrits de moins de 200 nucléotides ont été éliminés.

Les séquences obtenues ont été comparées à des séquences existantes sur diverses bases de données à l'aide du logiciel blast2go ([www.blast2go.org](http://www.blast2go.org)). Seules les homologues fortes, e-value inférieures à  $1e^{-10}$ , ont été conservées dans les analyses. Les séquences annotées obtenues ont été utilisées dans la base de données Gene Ontology (*via* blast2go) pour définir les fonctions



biologiques associées aux différents gènes annotés. Le logiciel Blast2go permet, par un système d'algorithme complexe, de mettre en évidence des gènes significativement sur- ou sous-exprimés chez un échantillon par rapport à un échantillon témoin. Dans le cadre de cette étude, le niveau d'expression des gènes chez les individus malades a été comparé au niveau d'expression de ces gènes chez les individus sains. Pour les gènes exprimés seulement chez les individus malades, une analyse blastn et blastx a été réalisée sur l'ensemble des séquences ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/)) pour retrouver des homologies avec des gènes ou des protéines connues. Les séquences ont également été comparées à la banque de données Ruphibase (<http://compgen.bio.unipd.it/ruphibase/>) contenant les 32 606 contigs séquencés chez la palourde japonaise par Milan et al. (2011).

### 3. Résultats-discussion

#### 3.1 Qualité des ARNs et des librairies

La pureté des ARN extraits a été testée au Nanodrop en mesurant l'absorption des échantillons à trois longueurs d'ondes, 230 nm, 260 nm et 280 nm qui représentent respectivement les maxima d'absorption des solvants, des acides nucléiques et des protéines. Les ratios 260/280 et 260/230 mesurés pour les deux lots sont supérieurs à 2 et indiquent donc des échantillons exempts de contamination par des protéines ou des produits utilisés lors de l'extraction (solvants). Les profils obtenus au Bioanalyseur (Agilent) indiquent que leurs ARNs sont très peu dégradés. Les quantités d'ARN extraites sont de  $410 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  pour les individus malades et de  $547 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  pour les individus sains.

#### 3.2 Résultats du séquençage

Dans la librairie, 253 671 328 séquences correspondant aux individus sains ont été séquencées et 169 202 692 séquences pour les individus malades.

A partir de ces séquences, 47 339 contigs (soit 113 238 923 bases) de 200 à 33 061 bases ont été assemblés (Figure VII.3). La taille moyenne des contigs est de 2 392 bases (N50 = 3 105).

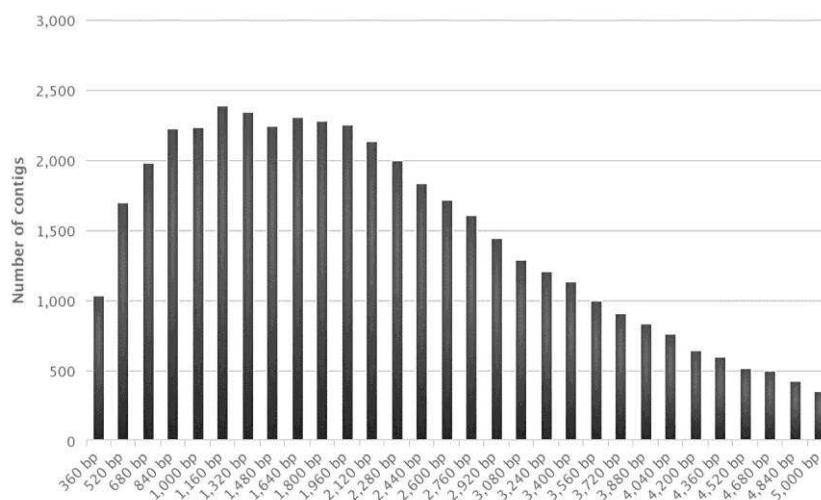


Figure VII.3. Nombre de contigs en fonction de leur longueur. Le graphique ne tient pas compte des contigs > 5000 pb

Parmi ces contigs, 15 849 (soit 33,5%) ont été annotés à des séquences existantes dans les bases de données interrogées par Blast2go. L'élimination des redondances et des annotations présentant des e-value trop faibles<sup>3</sup> ( $< 1e^{-10}$ ) a rapporté le nombre d'unigènes à 8 895.

<sup>3</sup> La e-value est une valeur statistique correspondant à  $E = 1-p$  ou  $p$  est la probabilité que l'homologie trouvée soit due au hasard. Plus la e-value est faible, plus l'homologie de séquence est fiable

Parmi ces 8 895 unigènes, 626 sont retrouvés uniquement chez les individus sains et 36 uniquement chez les individus malades.

### 3.3 Expression différentielle des gènes chez les individus malades

Une première analyse a permis de réaliser des diagrammes circulaires présentant les voies métaboliques sous-exprimées/réprimées (Figure VII.4) ou surexprimées/induites (Figure VII.5) chez les individus malades. Dans un second temps, une analyse plus fine a permis de dresser une liste de gènes présentant une expression significativement différente, répression ou induction, entre les individus sains et les individus malades. Cette liste ne se veut pas exhaustive et se concentre sur les gènes liés à la réponse ou la réplication virale et sur les gènes impliqués dans la réponse immunitaire ou les mécanismes de défense.

#### 3.3.1 Gènes sous-exprimés chez les individus malades

Chez les individus malades, 2 402 gènes présentent une sous-expression comparé aux individus sains. Les grandes fonctions cellulaires associées à ces gènes sous-exprimés sont regroupées dans la figure VII.4

*NB : certains gènes pouvant être impliqués dans diverses fonctions, l'addition des gènes associés à chaque fonction excède le nombre total de gènes sous-exprimés (4 496 contre 2 402).*

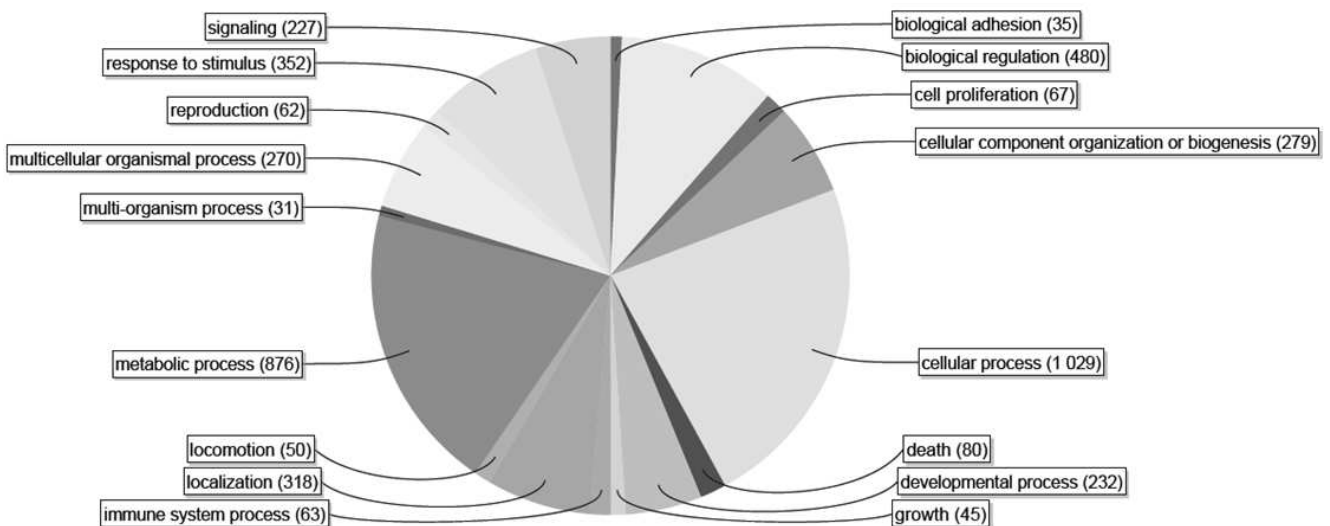


Figure VII.4. Grandes fonctions biologiques sous-exprimées chez les individus malades. Nombre de gènes impliqué entre parenthèses

Parmi ces gènes, un focus particulier a été réalisé sur ceux impliqués dans la réponse ou la reproduction virale et dans les mécanismes de défenses et le système immunitaire (Tableau VII.1).

Tableau VII.1. Gènes et processus biologiques associés aux contigs sous-exprimés chez les individus malades. Données blast2go.

(x0,47) = niveau d'expression du contigs chez les individus malades par rapport aux individus sains.

Nom du contig (x niveau d'expression)	Gène associé	Processus biologique
<i>Gènes impliqués dans la réponse ou la réplication virale</i>		
RPHIL_AP1S2.1.2 (x0,47)	ap-1 complex subunit sigma -2	reproduction virale
RPHIL_AP1G1.1.1 (x0,44)	ap-1 complex subunit gamma-1	reproduction virale / régulation de la défense de l'hôte contre le virus par le virus
RPHIL_LTOR5.2.2 (x0,22)	regulator complex protein lamtor5	réplication génome viral / réponse aux virus
RPHIL_SRPK1.1.1 (x0,44)	srsf protein kinase 2	régulation négative de la réplication du génome viral
RPHIL_PCBP1.1.1 (x0,28)	poly -binding protein 2-like	régulation négative de la réponse aux virus
RPHIL_RSAD2.1.1 (x0,5)	radical s-adenosyl methionine domain-containing protein 2	régulation négative de la réplication du génome viral / réponse de défense aux virus
RPHIL_RS15A.5.5 (x0,47)	40s ribosomal protein s15a	réponse aux virus
RPHIL_RPB1.3.13 (x0,4)	orf1ab polyprotein	diminution de la réponse de l'hôte par le virus
<i>Gènes impliqués dans les mécanismes de défense et le système immunitaire</i>		
RPHIL_RNGB.1.3 (x0,14)	baculoviral iap repeat-containing protein 3-like60s ribosomal protein l4	apoptose
RPHIL_BIR7A.12.20 (x0,25)	baculoviral iap repeat-containing protein 7-like	apoptose
RPHIL_2AAA.2.2 (x0,44)	serine threonine-protein phosphatase 2a 65 kda regulatory subunit a alpha isoform-like	Induction de l'apoptose
RPHIL_SMAD3.1.1 (x0,37)	mothers against decapentaplegic homolog 3	Induction de l'apoptose
RPHIL_BDEF.1.4 (x0,1)	big defensin 3	réponse de défense
RPHIL_BDEF.2.4 (x0,08)	big defensin 1	réponse de défense
RPHIL_DEFI.1.1 (x0,07)	defensin	réponse de défense
RPHIL_SRPK1.1.1 (x0,44)	srsf protein kinase 2	réponse immunitaire innée
RPHIL_GBP1.2.2 (x0,32)	interferon-induced guanylate-binding protein 1	réponse immunitaire
RPHIL_GBP4.1.1 (x0,2)	interferon-induced guanylate-binding protein 2	réponse immunitaire
RPHIL_TRAP1.3.3 (x0,38)	tnf receptor-associated protein 1	réponse immunitaire
RPHIL_CO3.6.10 (x0,08)	complement c3	régulation positive du complexe d'attaque membranaire / régulation positive de la phagocytose
RPHIL_MYD88.3.4 (x0,45)	myeloid differentiation primary response protein	réponse aux autres organismes / réponse de défense / système immunitaire
RPHIL_GBP5.1.1 (x0,42)	guanylate-binding protein 5	réponse aux autres organismes
RPHIL_NCAN.6.9 (x0,45)	low affinity immunoglobulin epsilon fc receptor	régulation positive de l'élimination d'autres cellules

L'analyse montre que des gènes aux fonctions biologiques antagonistes sont réprimés. D'une part des gènes codant pour les "activator protein" ap-1 qui sont des facteurs de transcription impliqués dans la réplication virale mais également la survie du virus dans l'hôte (Herbein et al. 2008, Kang et al. 2013) et d'autre part des gènes régulant négativement la réplication virale comme le gène codant pour la protéine SRSF. La fonction de cette protéine a été décrite dans le cas du virus de l'hépatite B où elle régule sa réplication en affectant la formation de la nucléocapside (Zheng et al. 2005). Pour la défense de l'hôte contre les virus, des gènes régulant positivement cette réponse sont réprimés ainsi que des gènes régulant négativement l'action de l'hôte sur le virus, comme le gène codant pour la poly-protéine ORF1AB qui est impliquée dans la régulation de l'interaction hôte-pathogène et qui favorise également la réplication virale (van der Meer et al. 1998). Parmi les gènes réprimés liés aux mécanismes de défense et au système immunitaire, de nombreux gènes concernent l'apoptose. Un antagonisme se retrouve là encore entre des gènes

induisant l'apoptose et les gènes codant pour les IAP (inhibitor of apoptosis proteins) qui inhibent l'apoptose en se fixant aux récepteurs du TNF (Tumor Necrosis factor). Le gène codant pour le récepteur du TNF est également réprimé. Ce dernier joue un rôle clé dans le système immunitaire en induisant la réaction inflammatoire. Chez le virus responsable de la peste porcine, la protéine virale A238L permet de bloquer la transcription de ce gène et ainsi limiter la réaction inflammatoire (Granja et al. 2006).

De nombreux gènes codant pour des molécules impliquées dans l'immunité innée, comme les défensines (peptides antimicrobiens), l'interféron, ou encore la sous-unité c3 du complément qui est à l'origine de l'initiation de la voie alterne du complément sont également réprimés. La persistance d'un virus dans un organisme hôte dépend de sa capacité à échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. A ce titre, de nombreuses revues traitent des mécanismes mis en place par les virus pour contrer les mécanismes de l'immunité innée (van de Sandt et al. 2012, Guha & Ayyavoo 2013) et particulièrement de la voie de l'interféron (Hugues et al. 2012) et de la voie du complément (Stoermer & Morrison 2011)

### 3.3.2 Gènes surexprimés chez les individus malades

Chez les individus malades, 1 237 gènes présentent une surexpression comparés aux individus sains. Les fonctions cellulaires représentées dans la figure suivante sont identiques à celle considérées pour les gènes réprimés à l'exception d'une seule : la reproduction virale (Figure VII.5).

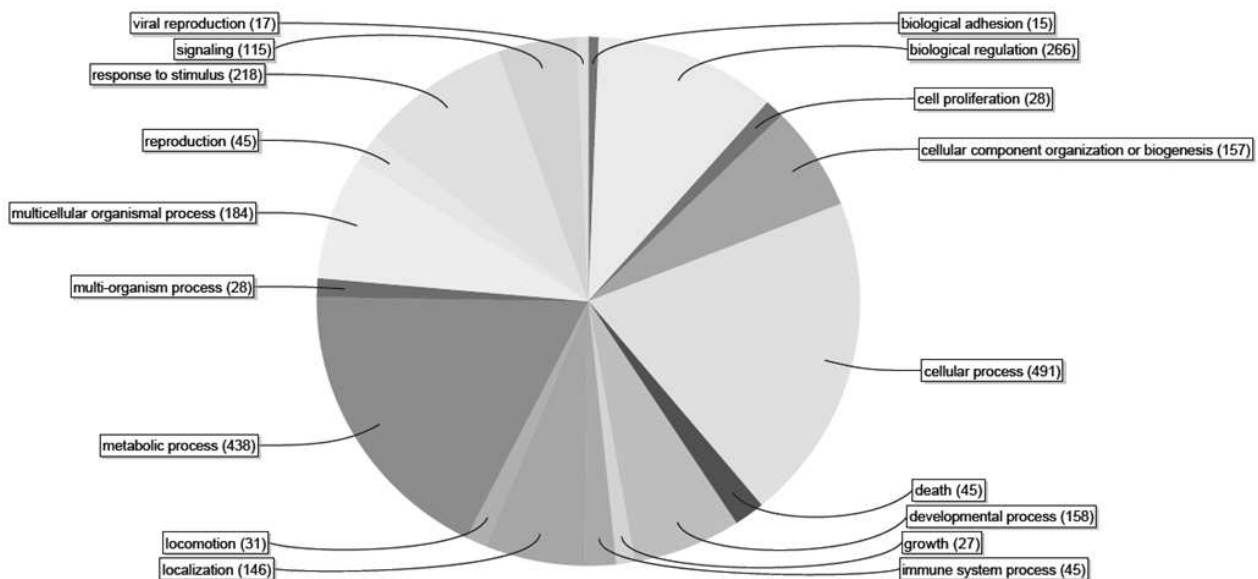


Figure VII.5. Grandes fonctions biologiques surexprimées chez les individus malades. Nombre de gènes impliqué entre parenthèses

NB : certains gènes pouvant être impliqués dans diverses fonctions, l'addition des gènes associés à chaque fonction excède le nombre total de gènes sous-exprimés (2 454 contre 1 237).

Tableau VII.2. Gènes et processus biologiques associés aux contigs surexprimés chez les individus malades. Données blast2go. (x4) = niveau d'expression du contigs chez les individus malades par rapport aux individus sains.

Nom du contig (x niveau d'expression)	Gène associé	Processus biologique
<b>Gènes impliqués dans la réponse ou la réplication virale</b>		
RPHIL_RL35.2.5	40s ribosomal protein s15	transcription virale
RPHIL_RS32.2.3 (x4,7)	ribosomal protein s3	transcription virale
RPHIL_RS5.1.3 (x3,6)	40s ribosomal protein s5	transcription virale
RPHIL_RL15.5.6 (x2,08)	ribosomal protein l15	transcription virale
RPHIL_RS26.1.3	ribosomal protein s26	transcription virale
RPHIL_RS10.2.7 (x4,9)	ribosomal protein s10	reproduction virale
RPHIL_RPAB5.1.3 (x2,4)	dna-directed rna polymerases and iii subunit rpabc5	transcription élongation du promoteur de la RNA polymérase III / régulation positive de la transcription virale
RPHIL_RPB11.2.3	dna-directed rna polymerase ii subunit rpb11-like	transcription initiation du promoteur de la RNA polymérase II / régulation positive de la transcription virale
RPHIL_TF2H4.1.1	general transcription factor iih subunit 4	transcription initiation du promoteur de la RNA polymérase II / regulation positive de la transcription virale
RPHIL_PPIA.2.10 (x3,1)	peptidylprolyl isomerase a (cyclophilin a)	desencapsulation du virus / entrée dans la cellule / ancrage du virus / régulation positive de la réplication virale / libération du virus de l'hôte
RPHIL_HSBP1.1.3 (x4)	hsbp1-like protein	fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de l'hôte
RPHIL_PCSK5.2.6	proprotein convertase subtilisin kexin type 5	assemblage, maturation et libération du virus
RPHIL_E2AK3.1.2 (x2,1)	interferon- double-stranded rna-activated kinase	apoptose des cellules infectées par un virus / réponse aux autres organismes
RPHIL_RAC1.3.8 (x3,6)	ras-related protein rac1	reproduction virale / réponse de défense aux virus par le virus
RPHIL_PAR12.4.11 (x4)	zinc finger ccch-type antiviral protein 1	regulation de la réponse aux virus par l'hôte
<b>Gènes impliqués dans les mécanismes de défense et le système immunitaire</b>		
RPHIL_RAC1.3.8 (x3,6)	ras-related protein rac1	apoptose / réponse inflammatoire
RPHIL_SOX10.1.1 (x3,4)	transcription factor sox-9	regulation negative de l'apoptose
RPHIL_NOTC1.1. (x4,3)	neurogenic locus notch homolog protein 1	regulation negative de la mort cellulaire et de l'apoptose
RPHIL_BIR7B.1.4 (x4,8)	baculoviral iap repeat-containing protein 7-b	anti-apoptose
RPHIL_XIAP.12.17 (x3,9)	baculoviral iap repeat-containing 2	mort cellulaire programmée
RPHIL_TREX1.1.2 (x12,8)	three prime repair exonuclease 2	réponse au stimulus de dommages à l'ADN / réparation de l'ADN
RPHIL_GPX2.1.1 (x13)	glutathione peroxidase 2	processus d'oxydo-réduction / réponse au stress oxydant
RPHIL_GPX1.1.4 (x11)	glutathione peroxidase 1	processus d'oxydo-réduction / réponse au stress oxydant
RPHIL_PFM.3.6 (x14)	fungistatic metabolite	processus d'oxydo-réduction / réponse au stress oxydant
RPHIL_MOXD2.1.2 (x11)	dbh-like 1	processus d'oxydo-réduction
RPHIL_AOX.1.1 (x11,8)	alternative oxidase isoform b	processus d'oxydo-réduction
RPHIL_SELK.1.2 (3,1)	selenoprotein k	réponse au stress oxydant / processus du système immunitaire
RPHIL_LCK.1.1 (x12)	tyrosine-protein kinase lck	régulation positive des processus du système immunitaire
RPHIL_RPC6.1.1 (2,3)	dna-directed rna polymerase iii subunit rpc6	régulation positive des processus du système immunitaire
RPHIL_TLR6.2.4 (x4,2)	toll-like receptor 2 type-1	réponse immunitaire innée
RPHIL_SPON2.1.1 (x5,6)	spondin-2	réponse immunitaire innée
RPHIL_LOXH1.2.4 (x2,7)	lipoxygenase homology domain-containing protein 1-like	réponse immunitaire innée
RPHIL_SAMH1.1.7 (x3,9)	sam domain and hd domain-containing protein 1-like	processus du système immunitaire
RPHIL_TNF15.1.2 (x12)	tumor necrosis factor ligand superfamily member	réponse immunitaire
RPHIL_GP126.1 (x11,4)	g-protein coupled receptor mth2	réponse immunitaire
RPHIL_LCK.1.1 (x12,1)	tyrosine-protein kinase lck	réponse à un stimulus / régulation positive du système immunitaire
RPHIL_FRRS1.6.18 (x4,4)	defense protein 3-like	réponse de defence aux protozoaires et aux bactéries
RPHIL_CHIT1.1.2 (x4,9)	chitotriosidase-1 isoform x2	réponse aux bactéries
RPHIL_TLP1.1. (x11,5)	thaumatin-like protein 1-like	réponse aux autres organismes
RPHIL_TLPH.1.1 (x12,1)	pathogenesis-related thaumatin-like protein	réponse aux autres organismes
RPHIL_PAL3.1.1 (x14,7)	phenylalanine ammonia-lyase	réponse au stress

De nombreux gènes codant pour des protéines ribosomiques sont induits. Les virus sont connus pour détourner et amplifier la machinerie cellulaire afin de se reproduire (Castello et al. 2009, revue de Sánchez et al. 2013). De nombreux virus à ARN comme les *retroviridae*, *Caliciviridae* et *Picornaviridae* codent pour des protéines virales qui décuplent les capacités de l'hôte à recruter les ARNm et les ribosomes (Alvarez et al. 2003, Lloyd 2006, Ventoso et al. 2006, Castelló et al. 2011). De plus, les protéines ribosomales ont, en plus de leur rôle dans la composition des ribosomes, de nombreuses fonctions secondaires comme la réparation de l'ADN ou l'apoptose (Wool 1996, Zimmermann 2003).

L'ensemble des étapes de la reproduction virale semble favorisé comme en témoigne l'induction de la cyclophilin A qui est impliquée dans bon nombre de ces étapes (Revue de Liu et al. 2013).

Des gènes permettant une régulation négative de la réplication virale sont également induits comme par exemple " zinc finger cch-type antiviral protein 1" qui inhibe la réplication virale en dégradant les ARNm (Kerns et al. 2008, Zhu et al. 2011)

Concernant les mécanismes de défenses et la réponse immunitaire, les mécanismes d'apoptose, de réponse au stress oxydant et de l'immunité semblent particulièrement touchés. Un antagonisme est à nouveau notable entre des gènes favorisant l'apoptose et d'autres l'inhibant. Toutefois, la majorité des gènes induits semble réguler de façon négative l'apoptose comme par exemple les gènes induisant des protéines de type IAP (Dubrez-Daloz et al. 2008).

L'expression de nombreux gènes induits dans les processus d'oxydo-réduction comme par exemple la glutathion peroxydase dont la surexpression avait déjà été mise en évidence lors du suivi terrain réalisé au cours de cette thèse (*Cf* chapitre III), montre l'existence d'un stress oxydant important au sein des individus présentant les signes de la BMD. De nombreuses infections virales sont connues pour provoquer un stress oxydant important chez l'organisme hôte (Peterhans et al. 1987, Ano et al. 2010, Tung et al. 2011, Lee et al. 2013, Paracha et al. 2013, Stukelj et al. 2013)

Différents gènes codant pour des protéines de stress sont également induits comme les Traumatins-like protein généralement cités chez les plantes dans le cadre de stress biotique ou abiotique (Wang et al. 2010c). La voie des interférons semble également être surexprimée. Ces protéines du système immunitaire sont particulièrement mises en jeu lors d'un stress viral (Samuel 2001, Zhou et al. 2013) et leur induction peut être induite par différents types de protéines comme " dna-directed rna polymerase iii subunit rpc6" (Chiu et al. 2009) et " toll-like receptor 2 " (Barbalat et al. 2009) elles-mêmes induites lors d'une infection virale.

### 3.4 Gènes spécifiques aux individus malades

Parmi les 265 contigs identifiés exclusivement chez les individus malades, seulement 14 ont été annotés dans la base de données Blast pour un gène (Blastn) ou une protéine connue (Blastx) à partir des séquences nucléotidiques. Ces contigs ont également été comparés à la base de données RUPHIBASE. Le tableau VII.3 regroupe les résultats d'annotations obtenus.

Tableau VII.3. Gènes (A) et protéines (B) associées aux contigs uniques séquencés chez les individus malades et correspondance avec des séquences présentes dans la RUPHIBASE. Les e-value sont données entre parenthèses

Nom du contig	A) Gène annoté (e-value) B) Protéine annotée (e-value)	Correspondance RUPHIBASE (e-value)
RPHIL_ZN862.3.18	B) zinc finger protein 862-like [ <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> ] ( $e^{-74}$ )	NON
RPHIL_BAF.1.2	B) barrier-to-autointegration factor A-like [ <i>Metaseiulus occidentalis</i> ] ( $e^{-12}$ )	OUI ( $e^{-38}$ )
RPHIL_BIR7A.11.20	B) Apoptosis 1 inhibitor [ <i>Crassostrea gigas</i> ] ( $e^{-20}$ )	NON
RPHIL_CYSP.1.1	A) <i>Trypanosoma rangeli</i> clone TR05926 cysteine peptidase gene, complete cds ( $e^{-44}$ ) B) Famille des cathepsin L	NON
RPHIL_MCPI.1.1	B) Serine protease inhibitor ( <i>Ruditapes philippinarum</i> ) ( $e^{-43}$ )	OUI ( $e^{-128}$ )
RPHIL_MICPUCDRAF_T_49684.1.1	A) <i>Diplonema papillatum</i> strain ATCC 50162 elongation factor 1 alpha-like protein mRNA, partial cds (0)	NON
RPHIL_PAR14.1.25	B) Poly [ADP-ribose] polymerase 14 [ <i>Crassostrea gigas</i> ] ( $e^{-62}$ ) B) reverse transcriptase [ <i>Bombyx mori</i> ] ( $e^{-92}$ )	OUI ( $e^{-145}$ )
RPHIL_POL2.4.16	B) Gag-Pol polyprotein [ <i>Schistosoma japonicum</i> ] ( $e^{-89}$ ) B) TPA: gag-pol polyprotein [ <i>Schistosoma mansoni</i> ] ( $e^{-85}$ )	OUI ( $e^{-17}$ )
RPHIL_R1AB.1.1	B) orf1ab polyprotein [Human coronavirus HKU1] (0,007)	NON
RPHIL_TBB.2.5	A) <i>Trypanosoma rangeli</i> clone TR05117 beta-tubulin gene, complete cds (0)	OUI ( $e^{-54}$ )
RPHIL_TREX2.1.1	B) three prime repair exonuclease 1 [ <i>Schistosoma japonicum</i> ] ( $e^{-16}$ )	OUI ( $e^{-16}$ )
RPHIL_TRPA1.3.8	B) Protein TRPA-1, isoform b [ <i>Caenorhabditis elegans</i> ] ( $e^{-37}$ )	NON
RPHIL_XIAP.4.17	B) Apoptosis inhibitor IAP [ <i>Acromyrmex echinatior</i> ] ( $e^{-33}$ )	OUI ( $e^{-34}$ )
RPHIL_ZN862.3.18	B) zinc finger protein 862-like [ <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> ] ( $e^{-74}$ )	NON

Parmi les contigs annotés, des processus liés à la réplication virale ou aux mécanismes de défenses de l'hôte sont identifiés comme Baf (Barrier to autointegration factor) qui semble impliqué dans la répression de la réplication virale (Wiebe & Traktman 2007, Ibrahim et al. 2013). Des gènes codant pour des mécanismes de défenses sont également retrouvés : les sérines protéases inhibiteurs qui ont un rôle dans la défense contre les pathogènes (Xue et al. 2009, La Peyre JF et al. 2010) ou des protéines impliquées dans la réparation des dommages causés à l'ADN comme la poly (ADP-ribose) polymérase (Yu et al. 2002, Rajawat et al. 2011) ou la three prime repair exonuclease 1 (Hasan et al. 2013, Unterholzner 2013).

Des protéines comme la cathepsin L, impliquée dans l'entrée des virus dans les cellules (Regan et al. 2008, Schornberg et al. 2009) ou la tubuline, pouvant être nécessaires à la formation des virus (Mayer et al. 1986, Fang et al. 2009) sont également retrouvées uniquement chez des palourdes



atteintes de la BMD. La présence d'une protéine apparentée à un coronavirus est également à noter.

Parmi ces contigs, l'analyse du RPHIL\_POL2.4.16 nous a paru particulièrement intéressante. La cartographie (Figure VII.6) du contigs nous apporte de nombreuses preuves de l'existence d'un *retroviridae* (famille des rétrovirus). En témoigne les différents domaines protéiques décrits :

- Domaine rve "Intégrase core domain" (e-value  $2,76e^{-04}$ ). L'intégrase permet l'intégration d'une copie d'ADN du génome viral dans le chromosome de l'hôte
- Domaine RT-LTR "Reverse transcriptase" (e-value  $6,89e^{-30}$ ). Reverse transcriptase de rétrotransposons et rétrovirus qui a de longues séquences terminales répétées (LTRs)
- Domaine RNase-HI-RT-Ty3 (e-value  $4,22e^{-17}$ ). RNase Hi décrite comme complément du gène de la reverse transcriptase chez les rétrovirus.
- Domaine RT-ZFREV like (e-value  $8,96e^{-03}$ ). Famille des reverses transcriptases. Témoigne d'un rétrotransposon ou d'un rétrovirus
- Domaine RVT-1 (e-value  $3,77e^{-05}$ ). Famille des reverses transcriptases (RNA dependant DNA polymerase). Témoigne d'un rétrotransposon ou d'un rétrovirus

On note également sur ce contig, une courte séquence spécifique de la palourde japonaise non annotée (e-value =  $e^{-17}$ ) suggérant l'intégration du virus dans le génome de l'hôte.

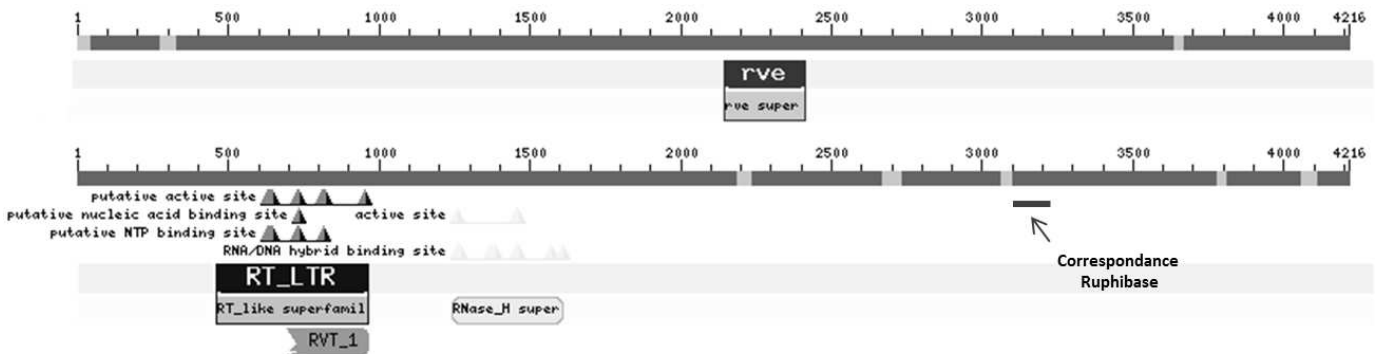


Figure VII.6. Cartographie du contig RPHIL\_POL2.4.16

#### 4. Conclusion

Lors d'une infection virale, les cellules infectées modifient le niveau d'expression de leurs gènes pour établir une réponse antivirale satisfaisante (Sánchez et al. 2013). Dans le même temps, les virus sont capables de détourner la machinerie cellulaire de l'hôte pour effectuer leur reproduction mais également, comme le prouve leur persistance dans les organismes hôtes, de contrôler la réponse de l'hôte pour échapper au système de défense et ne pas être éliminés avant d'avoir pu engendrer de nouvelles particules virales (Golem & Culver 2003, Galván-Alvarez et al. 2012, Huang et al. 2012, Silva da Costa et al. 2012, Carmo et al. 2013, Sánchez et al. 2013).

Les IAP (inhibitor of apoptosis proteins) dont certaines représentantes sont sous-exprimées alors que d'autres sont surexprimées sont à l'image de cet antagonisme entre les mécanismes de défense de l'hôte et les mécanismes de persistance du virus. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, constitue la réponse ultime de l'organisme face à un agent pathogène en éliminant la cellule infectée. Limitant fortement la production virale, de nombreux virus possèdent des gènes codant pour des protéines capables de retarder ou supprimer ce phénomène d'apoptose (Teodoro & Branton 1997, Miller & White 1998, Mischczak et al. 2013). Cet antagonisme est également notable pour de nombreuses molécules liées à la reproduction du virus et au système immunitaire. L'hôte va stimuler des fonctions de répression de la reproduction virale et d'induction des mécanismes de défense comme les interférons alors que le virus va coder pour des molécules pouvant interagir avec le métabolisme de l'hôte induisant notamment le recrutement des ribosomes pour la réplication ou l'inhibition de la voie alterne du complément.

La plus grande contrainte des techniques de séquençage haut-débit concerne les très grandes quantités de données engendrées et le temps nécessaire pour les traiter (Zhang et al. 2011).

Dans cette étude, une contrainte de temps ne nous a pas permis d'exploiter l'ensemble des séquences issues du séquençage et le choix d'analyse s'est porté sur les preuves de la présence potentielle d'un virus et des réactions principales de l'hôte vis-à-vis de la maladie. Les résultats montrent un impact important de la maladie sur l'hôte avec des actions antagonistes entre les systèmes de défense de l'hôte et les mécanismes de persistance du virus. La présence de séquences spécifiques de rétrovirus (LTR, rétro-transcriptase et intégrase) s'avère très intéressante pour l'identification prochaine de l'agent de la BMD. Les LTRs, longues séquences répétées terminales, ont un rôle de promoteur puissant de la transcription en 5' et en 3' font office de signal de coupure

précédant la polyadénylation. Dans le cytoplasme des cellules infectées, la rétro-transcriptase virale copie l'ARN du virus en ADN simple brin. Elle hydrolyse ensuite le brin d'ARN et copie l'ADN simple brin pour former un ADN bicaténaire qui sera intégré au génome de l'hôte via l'intégrase.

Une étiologie "rétrovirale" a déjà été mise en cause chez des mollusques bivalves dans le cadre des néoplasies chez la coque (Romalde et al. 2007) ou la mye (AboElkhair et al. 2009).

Les *retroviridae* sont également caractérisés par une taille d'une centaine de nanomètre et par une enveloppe. Or, ces données sont relativement contradictoires avec les observations réalisées en microscopie électronique à transmission sur les tissus infectés où les particules observées semblaient nues et d'une taille maximale de 50 nm.

L'analyse plus poussée des données de séquençage et particulièrement des séquences spécifiques aux individus malades et ne présentant aucune similarité avec des séquences identifiées dans la Rumphabase permettrait probablement d'affiner nos conclusions.

---

## **Conclusion générale et perspectives de recherche**

---

Comme énoncé par Snieszko en 1974, une maladie se définit comme le résultat d'une interaction complexe entre un pathogène, son ou ses hôtes, et l'environnement dans lequel ils évoluent. La compréhension du système dans sa globalité est nécessaire pour appréhender le fonctionnement d'une maladie et pouvoir à long terme, particulièrement dans le cas de la santé humaine ou dans le cas d'espèces exploitées à fort intérêt économique, la contrôler voire l'éradiquer ou tout du moins en prédire l'évolution.

Bien que ce travail de thèse ait une visée scientifique fondamentale de connaissance de la maladie, de son épizootiologie en passant par son impact sur l'hôte et l'agent qui en est responsable, son intérêt appliqué sur les aspects de gestion d'une population exploitée n'est pas à négliger pour autant.

Au travers de ces 7 chapitres, nous nous sommes intéressés aux compartiments identifiés par Snieszko et aux interactions qui en découlaient. Quelle est la répartition de la maladie et son évolution au cours du temps ? Quels sont les facteurs qui régissent sa distribution ? Quel est l'impact de la maladie sur l'organisme hôte ? Quel est l'agent responsable de la maladie ?

Autant de questions auxquelles nous avons tenté de répondre par diverses techniques et approches expérimentales dont les grandes conclusions sont présentées ici.

Les différents résultats obtenus durant cette thèse nous ouvrent également de nombreuses perspectives de recherche qui seront proposées dans le paragraphe 4.

## **1. Epizootiologie de la BMD**

---

L'épizootiologie est définie comme la science qui étudie la fréquence, la répartition, et le rôle des facteurs qui déterminent une maladie animale. Dans le cas de la BMD, dont la découverte reste relativement récente (2005), sa présence à l'échelle du bassin d'Arcachon depuis maintenant plus de 8 ans prouve que la maladie est bien installée et non le résultat d'un épisode infectieux mineur. Par ses caractéristiques lagunaires, le bassin d'Arcachon présente des facteurs de régulation des maladies qui divergent des schémas de régulation habituellement reconnu où le gradient de salinité océan-continent joue un rôle prépondérant. Pour la BMD, comme pour la perkinsose, on ne voit pas apparaître ce gradient océan vs. continent, commun aux écosystèmes côtiers mais un découpage du bassin en deux zones Nord-Ouest et Sud-Est, appelées ici sous-bassin Nord et sous-bassin Sud. Parmi l'ensemble des facteurs environnementaux suivis (salinité, température, taux de

recouvrement en herbier, % de matière organique et de pélites (sédiments < 63 µm), le sous-bassin Nord est caractérisé par un fort pourcentage en matière organique et en pélites, un fort taux d'émersion et des extrema de températures plus importants que le sous-bassin Sud. On retrouve les plus fortes prévalences pour la BMD et la perkinsose dans le sous-bassin Nord. Notre hypothèse est que ces caractéristiques, taux d'émersion et % en matière organique et en pélites, sont corrélables avec le turn-over des masses lors de la marée, autrement dit avec l'importance de l'hydrodynamisme. En effet, dans le sous-bassin Nord, seulement 1/3 des eaux s'engouffrent à chaque marée. Le turn-over, moins important, permettrait une meilleure sédimentation des particules fines et serait la cause (et/ou la conséquence) d'un temps passé à l'émersion plus important à cause d'un niveau hypsométrique plus élevé. Une plus forte dilution des hyphospores de *Perkinsus* permettrait une diminution de la probabilité de rencontre entre les hyphospores et un nouvel hôte et expliquerait la plus faible intensité parasitaire relevé dans le sous-bassin Sud.

Bien que les résultats ne soient pas comparables du fait d'une disparité au niveau de l'échantillonnage, l'analyse par strate réalisée dans le chapitre II montre également une forte disparité sous-bassin Nord vs. sous-bassin Sud.

On remarque une diminution de la prévalence entre 2010 et 2012 à l'échelle du bassin, qui, lorsqu'on s'y intéresse de plus près, est le résultat d'un sous-bassin Nord dont la prévalence reste constante (↗ effectifs totaux + ↗ effectifs malades) et d'un sous-bassin Sud dont la prévalence chute (↗ effectifs totaux + ↘ effectifs malades) pour les individus de 29 à 35 mm, soit des individus âgés de 2 à 3 ans. L'analyse de l'intensité (MPI) montre que cette dernière est constante entre les sous-bassins et dans le temps. On note toutefois que les stades 1 prédominent par rapport aux trois autres stades, ce qui suggère un début d'infestation relativement long et des stades avancés rapides où l'hôte n'est plus en mesure de se défendre contre la maladie et où la mort de l'individu intervient relativement rapidement.

Bien qu'à l'échelle des individus de taille > 23 mm, une prévalence de 3 % puisse sembler faible, les valeurs notées pour la fraction exploitable du stock (> 35 mm), de l'ordre de 15 % restent fortement préoccupantes pour l'activité de pêche. La diminution de la prévalence de la BMD notée à l'échelle du bassin d'Arcachon peut s'avérer encourageante mais il convient cependant de la nuancer. Les prévalences sur la fraction exploitable du stock restent constantes et les pertes d'effectifs enregistrées pour cette gamme de taille sont sans doute en partie imputables à la BMD. De plus, la diminution de la prévalence pour les individus de 29-35 mm pourrait être expliquée soit par un plus faible risque d'infection durant leur croissance, soit par une mortalité BMD-dépendante éliminant

des calculs bon nombre d'individus infectés. Dans le cadre d'un agent étiologique libre dans l'eau, comme c'est le cas de la perkinsose, le fort turn-over évoqué dans le chapitre I favoriserait notre première hypothèse. Cependant, les effectifs ayant plus faiblement augmenté dans le sous-bassin Sud par rapport au sous-bassin Nord, cela tendrait à considérer la seconde hypothèse comme plus pertinente. Pour finir, la diminution de la taille minimale d'infestation à 23 mm accroît le risque d'une mortalité juvénile et donc une plus faible probabilité pour les palourdes d'atteindre l'âge adulte et donc la taille légale de pêche (35 mm).

## **2. Impact de la BMD sur la palourde japonaise**

---

La comparaison entre individus de profondeur ne présentant pas de signes de la BMD et individus de surface présentant ou non des signes de la maladie nous permet de mettre en évidence divers phénomènes provoqués par la BMD chez les individus malades.

Les impacts de la maladie sur l'indice de condition, le système immunitaire et le métabolisme énergétique de l'hôte sont évidents. Les résultats de la transcriptomique comparative entre individus malades et individus sains viennent confirmer ces résultats.

On retrouve chez les individus malades une dualité très forte entre réponse de l'hôte et impact de l'agent causal.

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui ne peuvent vivre, *i.e.* être en mesure de se reproduire, en dehors d'une cellule hôte (Villareal 2004). A ce titre, ils sont capables de détourner la machinerie cellulaire de l'hôte pour permettre la production en grande quantité de particules virales mais également de contrer les défenses de l'hôte pour se maintenir dans l'organisme et accomplir leur reproduction (Golem & Culver 2003, Galván-Alvarez et al. 2012, Huang et al. 2012, Silva da Costa et al. 2012, Carmo et al. 2013, Sánchez et al. 2013).

Quant à l'immunité innée de l'hôte on en retrouve tout de même de nombreux effecteurs comme les molécules de la voie du complément, de la voie de l'interféron, de la phagocytose et d'autres peptides antimicrobiens comme les défensines.

L'induction du métabolisme énergétique de l'hôte pour la réplication virale est très visible à travers le stress oxydant provoqué. Les gènes codant pour des protéines anti-oxydantes sont induites (Catalase, Superoxyde dismutase) et on retrouve également ce type de protéine dans les analyses de transcriptomique comparative.

La comparaison entre individus de profondeur ne présentant pas de signes de la BMD et individus de surface présentant ou non des signes de la maladie met également en évidence un statut intermédiaire des palourdes de surface ne présentant pas de signes de la BMD. On distingue en effet un gradient de l'état de santé allant des palourdes de profondeur aux palourdes de surfaces avec la BMD en passant par un état intermédiaire : les palourdes de surface sans BMD. Le marqueur le plus représentatif de ce gradient est l'indice de condition qui diminue de 40 (profondeur) à 30 (surface sans BMD) puis 20 (surface avec BMD). Pour les autres facteurs étudiés, les palourdes de surfaces "saines" (en terme de BMD) présentent tantôt un profil proche de celui des palourdes de profondeur comme pour le taux de phagocytose ou un profil proche des individus malades comme pour la capacité de phagocytose ou l'intensité de *Perkinsus*. Il en est de même pour l'expression des gènes liés au métabolisme mitochondrial, à la réponse au stress oxydant, aux mécanismes de détoxification et au système immunitaire.

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer ce statut intermédiaire. Soit un stress biotique ou abiotique entraîne la remontée des palourdes à la surface ce qui les rends plus vulnérables à l'infection par la BMD (celles-ci sont toutefois capables de se ré-enfouir, ce qui explique la prévalence faible mais existante de la BMD en profondeur), hypothèse soutenue par l'intensité plus forte de la perkinsose chez les individus de surface (malades ou non), soit les palourdes de surface qui ne présentent pas de signes de la BMD, en sont déjà atteintes mais à un stade moindre où les signes pathognomoniques ne sont pas visibles et où l'impact sur l'organisme est moindre.

### **3. Virus or not virus ?**

---

Malgré toutes nos investigations, la question d'un agent étiologique viral reste légitime. De nombreux auteurs ont déjà pointé du doigt la difficulté d'affirmer une causalité virale pour les maladies (Rivers 1937, Friedrichs & Relman 1996, Lipkin 2009), et surtout de répondre aux postulats de Koch qui, même après plus d'un siècle après leur formulation, restent encore la preuve la plus persuasive de la causalité agent-maladie (Lipkin 2009). Dès 1937, Rivers souligne la difficulté pour cultiver certains virus et la présence de porteurs sains. Le virus étant intimement lié à la cellule hôte, il doit par conséquent être retrouvé dans toutes les lésions spécifiques sans que cela permette de définir s'il s'agit de la conséquence ou d'une cause de la maladie. L'auteur souligne également l'intérêt de se baser sur l'immunité adaptative (via la spécificité des anticorps), ce qui est impossible dans le cas des mollusques bivalves. Friedrichs & Relman (1996) impliquent les récentes



avancées de la technologie pour rediscuter des directives de Koch. Ils invoquent notamment la complexité du système parasite-hôte-environnement pour l'induction d'une maladie et indique que bien que la présence du pathogène soit nécessaire à la maladie, celle-ci n'est pas suffisante.

En 1991, Marley & McMichael mettent en évidence le caractère "non-observable" de la causalité. Seuls des évènements qui suggèrent un lien entre une cause et un effet sont observables.

Dans le cadre de la BMD, les arguments pour la présence d'un virus ne manquent pas.

On peut tout d'abord noter la présence de Virus-Like Particles (VLPs) dans l'ensemble des coupes histologiques de muscles atteints de la maladie mais aussi leur absence sur les coupes d'individus ne présentant aucun signe de la maladie. Ces particules peuvent être purifiées en grande quantités sur gradient de sucrose à partir de tissus malades. Ces deux premiers critères répondent aux premiers postulats de Koch.

A l'échelle génétique, les arguments sont également nombreux. On note notamment une forte surexpression de la voie de l'interféron qui est un antiviral extrêmement important dans les cellules (Revue de Unterholzner 2013) et de nombreuses répressions des mécanismes de l'apoptose relativement typiques des virus (Teodoro & Branton 1997, Miller & White 1998, Mischczak et al. 2013). On note également une forte augmentation du métabolisme énergétique de l'hôte, compatible avec le détournement de la machinerie cellulaire engendré par un agent viral pour sa reproduction.

Le dernier argument de la présence d'un virus est apporté par la séquence découverte chez les individus malades et présentant des LTRs et les gènes codant pour une intégrase et une reverse transcriptase qui sont des protéines spécifiques des *retroviridae* (rétrovirus). Les caractéristiques des *retroviridae* : génome à ARN, enveloppe virale, forme sphérique et taille de 80 à 100 nm sont toutefois en partie contradictoire avec les observations réalisées en microscopie optique à transmission sur les coupes de muscles malades où la taille des particules ne semblait pas excéder 50 nm et où aucune enveloppe n'était visible. Cependant la découverte d'une nouvelle famille de virus n'est pas à exclure.

Les arguments de la présence d'un ou plusieurs virus chez les individus malades mais pas chez les individus sains sont extrêmement nombreux. Toutefois, il nous est impossible à l'heure actuelle d'affirmer si ce ou ces virus sont la cause de la BMD ou juste des virus opportunistes intimement associés à la maladie.

Toutefois, l'absence d'agents de type bactéries, champignons et protozoaires lors des investigations en microscopie électronique à transmission, lors des analyses de PCR avec des amorces spécifiques

réalisées par Dang et al. (2008) mais également dans les résultats de transcriptomique comparative est favorable à une causalité entre maladies et agents viraux observés.

#### **4. Perspectives de recherche**

---

Parmi les diverses perspectives de recherche envisagées, la caractérisation de l'agent étiologique reste une des piste les plus importante à creuser. Les améliorations envisagées pour les essais d'infestations (injection directe dans la cavité palléale, utilisation de broyat d'individus malades) et pour l'utilisation de primocultures (cellules cardiaques) sont évidemment à tester. Etre en mesure de recréer la maladie chez des individus sains à partir des particules virales observées serait une preuve incontestable de l'étiologie virale de la maladie. Pour cela, la production en grande quantité de particules virales sur culture primaire serait un avantage énorme comparé à des purifications sur gradient de sucrose beaucoup plus fastidieuses. De plus, l'utilisation de primocultures limiterait les risques de perte du pouvoir infectieux des particules liés aux diverses étapes de purification.

Les primocultures permettraient également d'accroître les connaissances sur l'impact de la maladie chez l'hôte à une échelle cellulaire.

Dans le même temps, les nombreuses séquences issues de la transcriptomique sont loin d'avoir révélé tous leurs secrets et les pistes de travail sont multiples à partir d'une telle base de données. Parmi les séquences observées uniquement chez les individus malades mais ne présentant pas de correspondance avec des séquences préalablement obtenues dans la RUPhibase, notre objectif est de trouver d'autres séquences spécifiques du virus et ainsi de pouvoir en déterminer le génome.

Fredricks & Relman (1996) souligne l'importance de connaître la séquence virale pour déterminer d'une part la phylogénie du virus et d'autre part déterminer des sondes complémentaires de ce génome viral. Dans le cadre de l'étude de la BMD, la fabrication d'une sonde spécifique de l'agent étiologique présente de nombreux avantages. Lors des suivis réalisés sur le terrain et les études épidémiologiques, l'utilisation d'une sonde PCR permettrait une détection rapide et ne nécessitant pas le sacrifice de l'animal. Il serait également envisageable de suivre la cinétique de la maladie via cette sonde et pouvoir être en mesure de déterminer le temps nécessaire à l'agent pour entraîner la mort de l'individu hôte. Cette technique permettrait également de déterminer si les individus

"sains" sont ou non porteur de l'agent et si le virus peut s'intégrer dans le génome de l'hôte et s'y maintenir dans un état de dormance.

La découverte de séquences spécifiques à un *retroviridae* nous a amenés à reconsidérer notre hypothèse de départ sur la famille virale. En effet, la famille des *retroviridae* est caractérisée par des virus de forme sphérique, enveloppés, de 80 à 100 nm alors que nos observations en microscopie électronique à transmission indiquaient des particules icosaédriques de 30 à 40 nm non enveloppées qui pouvait indiquer des *Picornaviridae* ou des *Caliciviridae* (génomme à ARN). Une sonde spécifique permettrait de vérifier si les séquences virales retrouvées lors de la transcriptomique sont caractéristiques des particules virales purifiées sur gradient de sucrose.

Pour finir, l'idée d'un agent endémique qui aurait co-évolué avec les espèces natives et qui expliquerait qu'on n'ait pas d'impact sur ces dernières a été évoquée dans le chapitre II. L'utilisation d'une sonde spécifique de l'agent étiologique de la BMD, couplée à une approche de génomique permettrait une comparaison entre caractéristiques des espèces natives vs. l'espèce introduite. Il serait alors possible de déterminer quels facteurs permettent soit la résistance des espèces natives à cette maladie si l'agent est présent soit pourquoi l'agent n'est pas en mesure d'infecter ou tout du moins de se reproduire et de se maintenir dans ces espèces et donc dans le même temps, détecter les caractéristiques génétiques de la palourde japonaise qui la rendent sensible à cet agent. L'analyse des séquences spécifiques des palourdes saines obtenues en transcriptomique comparative pourrait également nous donner des pistes de gènes impliqués dans la résistance à la BMD. Pour aller plus loin encore dans l'identification des facteurs permettant l'établissement de la maladie, l'utilisation de la sonde PCR permettrait de mener des investigations à grande échelle sur d'autres régions. Il serait alors possible de déterminer si l'absence de la maladie sur d'autres populations de palourdes japonaises est le résultat de l'absence de l'agent pathogène ou bien s'il s'agit d'une forme de résistance de l'hôte, ou encore si les conditions environnementales sont défavorables à l'établissement de la maladie. Il serait possible par exemple de déterminer si les particules virales observées par Bateman et al. (2012) sur des palourdes japonaises de 10 mm en Grande-Bretagne correspondent aux mêmes particules virales observées sur le bassin d'Arcachon.

De telles connaissances sur l'épizootiologie de la BMD et notamment les facteurs environnementaux pouvant l'influencer tout comme la découverte éventuelle de populations de palourdes japonaises présentant une forme de résistance à la maladie présentent un intérêt majeur pour les mesures de gestions à entreprendre pour limiter l'impact de la maladie à l'échelle du bassin d'Arcachon.

---

## **Références bibliographiques**

---

- AboElkhair M, Synard S, Siah A, Pariseau J, Davidson J, Johnson G et al.** (2009) *Reverse transcriptase activity in tissue of the soft shell clam Mya arenaria affected with haemic neoplasia.* Journal of Invertebrate Pathology 102(2): 133-140
- AboElkhair M, Iwamoto T, Clark KF, McKenna P, Siah A, Greenwood SJ et al.** (2012) *Lack of detection of a putative retrovirus associated with haemic neoplasia in the soft shell clam Mya arenaria.* Journal of Invertebrate Pathology 109(1): 97-104
- Adolphe M, Barlovatz-Meimon G** (1988) *Culture de cellules animales. In : Culture de cellules animales méthodologies, applications.* Eds INSERM
- Ahn KJ, Kim KH** (2001) *Effect of temperature and salinity on in vitro zoosporulation of Perkinsus sp. in Manila clams Ruditapes philippinarum.* Diseases of Aquatic Organism 48: 43-46
- Allam B, Ashton-Alcox K, Ford SE** (2001) *Hemocyte activities associated with resistance to brown ring disease in Ruditapes spp. clams.* Developmental and Comparative Immunology 25(5-6): 365-375
- Allam B, Paillard C, Auffret M, Ford SE** (2006) *Effects of the pathogenic Vibrio tapetis on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following in vivo challenge.* Fish and Shellfish Immunology 20: 384-397
- Alvarez E, Menendez-Arias L, Carrasco L** (2003) *The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases.* Journal of Virology 77(23): 12392-12400
- Anders S, Huber W** (2010) *Differential expression analysis for sequence count data.* Genome Biology 11: R106
- Anderson RM, Gordon DM** (1982) *Processes influencing the distribution of parasite numbers within host populations with special emphasis on parasite-induced host mortalities.* Parasitology 85:373-398
- Ano Y, Saduk A, Kimata T, Uraki R, Sugiura K, Onodotera T** (2010) *Oxidative damage to neurons caused by the induction of microglial NADPH oxidase in encephalomyocarditis virus infection.* Neuroscience Letter 469(1): 39-43
- Ansoerge WJ** (2009) *Next-generation DNA sequencing techniques.* New Biotechnology 25: 195-203

- Arzul I, Michel J, Chollet B, Robert M, Miossec L, Garcia C et al.** (2009) *Molecular characterization of parasites of the genus Perkinsus present in clams from French producing areas*. Journal of Shellfish Research (Abstract) 28: 681
- Arzul I, Renault T, Lipart C** (2001a) *Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission*. Diseases of Aquatic Organisms 46(1): 1-6
- Arzul I, Renault T, Lipart C, Davidson AJ** (2001b) *Evidence for interspecies transmission of oysters herpesvirus in marine bivalves*. Journal of General Virology 82: 865-870
- Attrill MJ, Rundle SD** (2002) *Ecotone or ecocline: ecological boundaries in estuaries*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 55: 929-936
- Auby I** (1991) *Contribution à l'étude écologique des herbiers de Zostera noltii dans la bassin d'Arcachon: dynamique, production et dégradation, macrofaune associée*. Thèse de doctorat, université Bordeaux 1
- Auby I** (1993) *Evolution de la richesse biologique du bassin d'Arcachon*. Rapport Société Scientifique d'Arcachon. Laboratoire d'océanographie biologique, IFREMER
- Auzoux-Bordenave S, Vigario AM, Ruano F, Domart-Coulon I, Doumenc D** (1995) *In vitro sporulation of the clam pathogen Perkinsus atlanticus (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions*. Journal of Shellfish Research 14: 469-475

---

**B**

- Bachelet G, Dauvin JC** (1993) *Distribution quantitative de la macrofaune benthique des sables intertidaux du bassin d'Arcachon*. Oceanologica Acta 16: 83-97
- Bachelet G, de Montaudouin X, Dauvin JC** (1996) *The quantitative distribution of subtidal macrozoobenthic assemblages in Arcachon Bay in relation to environmental factors: a multivariate analysis*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 42: 371-391
- Barbalat R, Lau L, Locksley Rm, Barton GM** (2009) *Toll-like receptor 2 in inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands*. Nature Immunology 10(11): 1200-1207
- Baretta JW, Malschaert JFP** (1988) *Distribution and abundance of the zooplankton of the Ems estuary (North Sea)*. Netherlands Journal of Sea Research 22: 69-81

- Bateman KS, White P, Longshaw M** (2012) *Virus-like particles associated with mortalities of the Manila clam Ruditapes philippinarum in England*. Diseases of Aquatic Organisms 99: 163-167
- Bayne CJ** (1998) *Invertebrate cell culture considerations: insect, ticks, shellfish, and worms*. Methods in Cell Biology 57: 187-201
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG et al.** (2008) *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*. Nature 456(7218): 53-59
- Bhattacharya CG** (1967) *A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components*. Biometrics 23(1): 115-135
- Binias C, Do VT, Jude-Lemeilleur F, Plus M, Froidefond JM, de Montaudouin X** (2013) *Environmental factors contributing to the development of Brown Muscle Disease and Perkinsosis in Manila clams (Ruditapes philippinarum) and trematodiasis in cockles (Cerastoderma edule) of Arcachon Bay*. Marine Ecology 12087 doi:10.1111
- Birmelin C, Pipe RK, Golfarb PS, Livingstone DR** (1999) *Primary cell culture of the digestive gland on the marine mussel Mytilus edulis: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructure changes*. Marine Biology 135: 65-75
- Blanchet H, de Montaudouin X, Chardy P, Bachelet G** (2005) *Structuring factors and recent changes in subtidal macrozoobenthic communities of a coastal lagoon, Arcachon Bay (France)*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 64: 561-576
- Blanchet H, de Montaudouin X, Lucas A, Chardy P** (2004) *Heterogeneity of macrozoobenthic assemblages within a Zostera noltii seagrass bed: diversity, abundance, biomass and structuring factors*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 61: 111-123
- Bouchet JM** (1993) *Stratifications, fronts halins dans une lagune mésotidale (bassin d'Arcachon - France)*. In: Sorbe J-C, Jouanneau J-M (ed) 3e Colloque International d'Océanographie du Golfe de Gascogne. Station Marine d'Arcachon, Arcachon: 33-39
- Boulo V, Cadoret JP, Le Marrec F, Dorange G, Mialhe E** (1996) *Transient expression of luciferase reporter gene after lipofection in oyster (Crassostrea gigas) primary cell cultures*. Molecular Marine Biology and Biotechnology 5(3): 167-174
- Brussaard CPD** (2004) *Viral control of phytoplankton populations - a review*. Journal of Eukaryotic Microbiology 51(2): 125-138

- Buchanan JT, La Peyre JF, Cooper RK, Tiersh TR** (1999) *Improved attachment and spreading in primary cell cultures of the eastern oyster, Crassostrea virginica*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 35: 593-598
- Buggs RJA, Chamala S, Wu WEI, Gao LU, May GD, Schnable PS et al.** (2010) *Characterization of duplicate gene evolution in the recent natural allopolyploid Tragopogon miscellus by next-generation sequencing and SequenomPLEX MassARRAY genotyping*. *Molecular Ecology* 19: 132-146
- Burreson EM, Ragone Calvo LM** (1996) *Epizootiology of Perkinsus marinus disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985*. *Journal of Shellfish Research* 15: 17-34
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW** (1997) *Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited*. *Journal of Parasitology* 83: 575-583
- Bushek D, Ford SE, Chintala MM** (2002) *Comparison of in-vitro cultured and wild-type Perkinsus marinus. III. Fecal elimination and its role in transmission*. *Diseases of Aquatic Organisms* 51: 217-225
- 
- C**
- Canesi L, Barmo C, Fabbri R, Ciacci C, Vergani L, Roch P et al.** (2010) *Effects of Vibrio challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Pharmacology* 152(3): 399-406
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C** (2002) *Bacteria-hemocyte interaction and phagocytosis in marine bivalves*. *Microscopy Research and Technique* 57: 469-476
- Carballal MJ, Villalba A, Iglesias D** (2003) *Virus-like particles associated with large foci of heavy hemocytic infiltration in cockles Cerastoderma edule from Galicia (NW Spain)*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 234-237
- Carmo LS, Resende RO, Silva LP, Ribeiro SG, Mehta A** (2013) *Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in Nicotiana benthamiana*. *Proteomics* in press
- Carnegie RB** (2005) *Effects in molluscs culture*. In: K.Rohde (eds) *Marine parasitology*. Collingwood, Aust: CSIRO & CABI p. 391-398



- Casadevall A, Pirofski LA** (1999) *Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity*. *Infection and Immunity* 67: 3703-3713
- Casadevall A, Pirofski LA** (2003) *Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism*. *Trends in Microbiology* 11: 157-158
- Castelló A, Alvarez E, Carrasco L** (2011) *The multifaceted poliovirus 2A proteases: regulation of gene expression by picornavirus proteases*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 369648
- Castelló A, Quintas A, Sanchèz EG, Sabina P, Nogal M, Carrasco L et al.** (2009) *Regulation of host translational machinery by african swine fever virus*. *PLoS Pathogens* 5(8): 1000562
- Chen J, Li Q, Kong L, Yu H** (2011) *How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: the case study of a poorly understood marine fauna*. *PLoS ONE* 6: e21326
- Chen S, Yang P, Jiang F, Wei Y, Ma Z, Kang L** (2010) *De novo analysis of transcriptome dynamics in the Migratory Locust during the development of phase traits*. *PLoS ONE* 5(12): 15633
- Chen SN, Wen CM** (1999) *Establishment of cell lines derived from oyster, Crassostrea gigas Thunberg and hard clam, Meretrix lusoria Röding*. *Methods in Cell Sciences* 21: 183-192
- Cheval J, Sauvage V, Frangeul L, Dacheux L, Guigon G, Dumey N et al.** (2011) *Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples*. *Journal of Clinical Microbiology* 49(9): 3268-3275
- Chiu YH, MacMillan JB, Chen ZJ** (2009) *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway*. *Cell* 138(3): 576-591
- Choi KS, Park KI** (2010) *Review on the protozoan parasite Perkinsus olseni (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters*. In: Ishimatsu A, Lie H-J (eds) *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea* 269-281
- Choi KS, Park KI, Lee KW, Matsuoka K** (2002) *Infection intensity, prevalence, and histopathology of Perkinsus sp. in the Manila clam, Ruditapes philippinarum, in Isahaya bay, Japan*. *Journal of Shellfish Research* 21: 119-125
- Choi KS, Wilson EA, Lewis DH, Powell EN, Ray SM** (1989) *The energetic cost of Perkinsus marinus parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate methods*. *Journal of Shellfish Research* 8: 125-131
- Chu FLE** (2000) *Defense mechanisms of marine bivalves*. *Advances in Marine Biology* 5: 1-42

- Chu FLE, La Peyre JF** (1993) *Perkinsus marinus susceptibility and defense related activities in eastern oyster Crassostrea virginica: temperature effect*. Diseases of Aquatic Organisms 16: 223-234
- Chu FLE, La Peyre JF, Burreson CS** (1993) *Perkinsus marinus infection and potential defense related activities in eastern oyster Crassostrea virginica: salinity effect*. Journal of Invertebrate Pathology 62: 226-232
- Cigarría J, Rodríguez JM, Fernández JM** (1997) *Impact of Perkinsus sp. on Manila clam Ruditapes philippinarum beds*. Diseases of Aquatic Organisms 29: 117-120
- Cirulli ET, Goldstein DB** (2010) *Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing*. Nature Reviews Genetics 11: 415-425
- Combes C** (1995) *Interactions durables – Ecologie et évolution du parasitisme*. Masson (eds) Paris
- Comps M, Bonami JR, Vago C, Campillo A** (1976) *Une virose de l'huître portugaise (Crassostrea angulata)*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris 282: 1991-1993
- Comps M, Herbaut C, Fougerousse A, Laporte F** (2001) *Progress in pathological characterization of Syndrome 85 in the black-lip pearl oyster Pinctada margaritifera*. Aquatic Living Resources 14: 195-202
- Coulon I** (1993) *Mise au point d'un système contrôlé de culture de cellules de cœur d'huître Crassostrea gigas. Application au test de la toxicité des produits chimiques en milieu aquatique*. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique de Paris-Grignon
- Cousserans F** (1975) *Recherches sur la culture de cellules de mollusques marins et sur l'emploi de ces systèmes cellulaires en pathologie marine*. Thèse de doctorat, Université du Languedoc
- Cousserans F** (1979) *Recherche sur la culture de cellules de mollusques marins*. Haliotis 8: 321-337
- Crane MJ, Benzie JAH** (1999) *The aquaculture CRC international workshop on invertebrate cell culture 2-4 november 1997*. Methods in cell science 21: 171-172
- Crosby MP, Roberts CF** (1990) *Seasonal infection intensity cycle of the parasite Perkinsus marinus (and an absence of Haplosporidium spp.) in oysters from a south Caroline salt marsh*. Diseases of Aquatic Organisms 9: 149-155

- 
- Daines B, Wang H, Li Y, Han Y, Gibbs R, Chen R** (2009) *High-throughput multiplex sequencing to discover copy number variants in Drosophila*. *Genetics* 182(4): 935-941
- Dang C** (2009) *Dynamique des populations de palourdes japonaises (Ruditapes philippinarum) dans le bassin d'Arcachon - conséquences sur la gestion des stocks exploités*. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1
- Dang C, de Montaudouin X** (2009) *Brown muscle disease and Manila clam Ruditapes philippinarum dynamics in Arcachon Bay, France*. *Journal of Shellfish Research* 28(2): 355-362
- Dang C, de Montaudouin X, Bald J, Jude F, Raymond N, Lanceleur L et al.** (2009a) *Testing the enemy release hypothesis: trematode parasites in the non-indigenous Manila clam Ruditapes philippinarum*. *Hydrobiologia* 630(1): 139-148
- Dang C, de Montaudouin X, Caill-Milly N, Trumbic Ž** (2010a) *Spatio-temporal patterns of perkinsosis in the Manila clam Ruditapes philippinarum from Arcachon Bay (SW France)*. *Diseases of Aquatic Organisms* 91: 151-159
- Dang C, de Montaudouin X, Gam M, Paroissin C, Bru N, Caill-Milly N** (2010b) *The Manila clam population in Arcachon Bay (SW France): Can it be kept sustainable?* *Journal of Sea Research* 63: 108-118
- Dang C, de Montaudouin X, Gonzalez P, Mesmer-Dudons N, Caill-Milly N** (2008) *Brown Muscle Disease (BMD), an emergent pathology affecting Manila clam Ruditapes philippinarum in Arcachon bay (SW France)*. *Diseases of Aquatic Organisms* 80: 219-228
- Dang C, Gonzalez P, Mesmer-Dudons N, Bonami JR, Caill-Milly N, de Montaudouin X** (2009b) *Virus-like particles associated with Brown Muscle Disease in Manila clam (Ruditapes philippinarum) in Arcachon Bay (France)*. *Journal of Fish Diseases* 32: 577-584
- Dang C, Sauriau P.-G, Savoye N, Caill-Milly N, Martinez P, de Montaudouin X** (2009c) *Determination of trophic sources of Manila clam by spatial analysis of stable isotopes ( $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{15}N$ ) in Arcachon Bay (SW France)*. *Marine Ecology Progress Series* 387: 167-177
- David V, Chardy P, Sautour B** (2006) *Fitting a predator-prey model to zooplankton time-series data in the Gironde estuary (France): Ecological significance of the parameters*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 67: 605-617

- de Montaudouin** (1997) *Potential of bivalve's secondary settlement differs with species: a comparison between cockle (Cerastoderma edule) and clam (Ruditapes philippinarum) juvenile resuspension.* Marine Biology 128: 639-648
- de Montaudouin X, Binias C, Lassalle G** (2012) *Assessing parasite community structure in cockles Cerastoderma edule at various spatio-temporal scales.* Estuarine, Coastal and Shelf Science 110: 54-60.
- de Montaudouin X, Kisielewski I, Bachelet G, Desclaux C** (2000) *A census of macroparasites in an intertidal bivalve community, Arcachon Bay, France.* Oceanologica Acta 23: 453-468
- De Zoysa M, Whang I, Nikapitiya C, Oh C, Choi CY, Lee J** (2011) *Transcriptional analysis of disk abalone (Haliotis discus discus) antioxidant enzymes against marine bacteria and virus challenge.* Fish & Shellfish Immunology 31: 155-60
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Queré C, Miner C et al.** (2003) *Effect of mono-specific algal diet on immune functions in two bivalves species Crassostrea virginica and Ruditapes philippinarum.* Journal of Experimental Biology 206: 3053-3064
- Deniau S** (2000) *Essais de propagation in vitro de virus de type herpès infectant les mollusques bivalves marins et contribution à l'étude des interactions hôte-virus.* Thèse de doctorat, Ecole Pratique des Hautes Etudes
- Desai N, Antonopoulos D, Gilbert JA, Glass EM, Meyer F** (2012) *From genomics to metagenomics.* Current Opinion in Biotechnology 23(1):72-6
- Desclaux C, de Montaudouin X, Bachelet G** (2004) *Cockle (Cerastoderma edule) population mortality: the role of the digenean parasite Himasthla quissetensis.* Marine Ecology Progress Series 279: 141-150
- Domart-Coulon I, Auzoux-Bordenave S, Doumenc D, Khalanski M** (2000) *Cytotoxicity assessment of antibiofouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures.* Toxicology in Vitro 14: 245-251
- Domart-Coulon I, Doumenc D, Auzoux-Bordenave S, Le Fichant Y** (1994) *Identification of media supplements that improve the viability of primary cell cultures of Crassostrea gigas oysters.* Cytotechnology 16: 109-120

- Donaghy L, Lambert C, Choi KS, Soudant P** (2009) *Hemocytes of the carpet shell clam (Ruditapes decussatus) and the Manila clam (Ruditapes philippinarum): Current knowledge and future prospects*. *Aquaculture* 297: 10-24
- Droguet M** (2006) *Etude des caractéristiques fonctionnelles des cardiomyocytes d'huîtres en culture*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale
- Drosten C, Günther S, Preiser W, Van der Werf S, Brodt HR, Becker S et al.** (2003) *Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome*. *The New England Journal of Medicine* 348: 1967-1976
- Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J** (2008) *IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins*. *Cell Cycle* 7: 1036-1045

---

**E**

- Elandalloussi LM, Carrasco N, Roque A, Fernández-Tejedor M, Furones D** (2008) *Occurrence of Perkinsus sp. in two clam species (Ruditapes philippinarum and R. decussatus) from the Ebro delta, Spain*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 28: 1-9

---

**F**

- Fang M, Theilmann DA** (2009) *AcMNPV EXONO (AC141) which is required for the efficient egress of budded virus nucleocapsids interacts with beta-tubulin*. *Virology* 385(2): 496-504
- FAO** (2005) *Cultured aquatic species information programme*. *R. philippinarum*.
- FAO** (2011) *Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2009*. Rome
- FAO** (2012) *The state of world fisheries and aquaculture 2012*. Rome
- Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G** (2006) *BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies*. *Nucleic Acids Research* 34: 22
- Feldmeyer B, Wheat C, Krezdorn N, Rotter B, Pfenninger M** (2011) *Short read Illumina data for the de novo assembly of a non-model snail species transcriptome (Radix balthica, Basommatophora, Pulmonata), and a comparison of assembler performance*. *BMC Genomics* 12(1): 317

- Feng SY** (1988) *Cellular defense mechanisms of oysters and mussels*. American Fisheries Society 18: 153-168
- Flassch JP, Leborgne Y** (1992) *Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the japanese Manila clam (Tapes philippinarum) and the effects on aquaculture production and natural settlement*. ICES Marine Science symposium 194: 92-96
- Flye-Sainte-Marie J** (2008) *Ecophysiology of brown ring disease in the Manila clam Ruditapes philippinarum, experimental and modeling approach*. Thèse de doctorat, Vrije Universiteit Amsterdam
- Flye-Sainte-Marie J, Jean F, Ford SE, Paillard C** (2008) *Effect of sediment grain-size on development of brown ring disease in the Manila clam Ruditapes philippinarum*. Aquaculture 278: 184-187
- Flye-Sainte-Marie J, Pouvreau S, Paillard C, Jean F** (2007) *Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam Ruditapes philippinarum*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 349: 378-389
- Flye-Sainte-Marie J, Soudant P, Lambert C, Le Goic N, Gonçalves M, Travers MA et al.** (2009) *Variability of the hemocyte parameters of Ruditapes philippinarum in the field during an annual cycle*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 377: 1-11
- Fredricks DN, Relman DA** (1996) *Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates*. Clinical Microbiology Reviews 9(1): 18-33
- Fryer JL, Lannan CN** (1994) *Rickettsial and chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves, and crustaceans*. Zoological Studies 33: 95-107

---

**G**

- Galván-Alvarez D, Mendoza-Cano F, Hernández-López J, Sánchez-Paz A** (2012) *Experimental evidence of metabolic disturbance in the white shrimp Penaeus vannamei induced by the Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)*. Journal of Invertebrate Pathology 111: 60-67
- Garg R, Patel RK, Tyagi AK, Jain M** (2011) *De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification*. DNA Research 18(1): 53-63
- Gassiat L** (1989) *Hydrodynamique et évolution sédimentaire d'un système lagune-flèche littorale. Le bassin d'Arcachon et la flèche du Cap Ferret*. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1

- Gauthier JD, Soniat TM, Rogers JS** (1990) *A parasitological survey of oysters along salinity gradient in coastal Louisiana*. *Journal of World Aquaculture Society* 21: 105-115
- Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G et al.** (2007) *Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections*. *Plos Pathogens* 3: 64
- Ghiselli F, Milani L, Chang PL, Hedgecock D, Davis JP, Nuzhdin SV et al.** (2012) *De novo assembly of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* transcriptome provides new insights into expression bias, mitochondrial doubly uniparental inheritance and sex determination*. *Molecular Biology & Evolution* 29: 771-786
- Giessauf A, Flaim M, Dierich MP, Würzner R** (2002) *A technique for isolation of rubella virus-like particles by sucrose gradient ultracentrifugation using Coomassie brilliant blue G crystals*. *Analytical biochemistry* 308(2): 232-238
- Goffard A** (2011) *Culture cellulaire et virologie. Intérêts et applications de la culture cellulaire en virologie*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Biologie clinique, 90-60-0057
- Goggin CL** (1996) *Effect of Perkinsus sp. (Protozoa, Apicomplexa) on the weight of Tridacna crocea (Mollusca, bivalvia) from Lizard island, Great Barrier Reef*. *Aquaculture* 141: 25-30
- Goldsmith CS, Miller SE** (2009) *Modern uses of electron microscopy for detection of viruses*. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 552-563
- Golem S, Culver JN** (2003) *Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 16: 681-688
- Gouletquer P, Heral M** (1997) *Marine Molluscan Production Trends in France: From Fisheries to Aquaculture*. NOAA Technical Report NMFS 129: 137-164
- 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)*. International Council for the Exploration of the Sea, Cascais (Portugal), September 16-19
- Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, Del Aguila C, Carrascosa AL, Salas ML et al.** (2006) *The viral protein A238L inhibits TNF-alpha expression through a CBP/p300 transcriptional coactivators pathways*. *Journal of Immunology* 176(1): 451-462
- Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF et al.** (2006) *Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA*. *Nature* 444: 330-336

- Grizel H** (1974) *Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris 279: 783-785
- Grizel H, Mialhe E, Chagot D, Boulo V, Bachère E** (1988) *Bonamiasis: A model study of diseases in marine molluscs*. American Fisheries Society 18: 1-4
- Guha D, Ayyavoo V** (2013) *Innate immune evasion strategies by human immunodeficiency virus type 1*. ISRN AIDS 954806
- Guo Y, Cheng A, Wang M, Zhou Y** (2009) *Purification of anadid herpes virus 1 particles by tangential flow ultrafiltration and sucrose gradient ultracentrifugation*. Journal of Virological Methods 161(1): 1-6
- Guralnick R, Hall E, Perkins S** (2004) *A comparative approach to understanding causes and consequences of mollusc-digenean size relationships: a case study with Allocreadiid trematodes and Cyclocalyx clams*. Journal of Parasitology 90(6): 1253-1262

---

**H**

- Hall N** (2007) *Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology*. Journal of Experimental Biology 210: 1518-1525
- Hanana H, Talarmin H, Droguet M, Pennec JP, Marcorelles P, Gobin E et al.** (2008) *Etablissement d'une culture primaire de cellules cardiaques de palourdes – Utilisation du bioessai pour évaluer l'impact d'une phycotoxine, l'acide okadaïque*. 14ème colloque international de la recherche en IUT Lyon-Villeurbanne 29-30 mai
- Hansen EL** (1976) *Initiating a cell line from embryos of the snail Biomphalaria glabrata*. Tissue Culture Association Manual 5(1): 1009-1010
- Harrang E** (2012) *Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la caractérisation de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose, et pour la détection de signatures de la sélection naturelle*. Thèse de doctorat, Université de la Rochelle
- Hasan M, Koch J, Rakheja D, Pattnait AK, Brugaros J, Dozmorov I** (2013) *Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes*. Nature Immunology 14(1): 61-71



- Hauten C, Hawkins LE, Hutchinson S** (2001) *Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* L.* Fish and Shellfish Immunology 11(2): 143-153
- Hégaret H, da Silva PM, Wikfors GH, Lambert C, de Bettignies T, Shumway SE et al.** (2007) *Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus* sp., severity to toxic-algal exposures.* Aquatic toxicology 84: 469-479
- Herbein G, Varin A, Larbi A, Fortin C, Malhknecht U, Fulop T** (2008) *Nef and TNFalpha are coplayers that favor HIV-1 replication in monocytic cells and primary macrophages.* Current HIV Research 6(2): 117-129
- Herman SS, Mihursky JA, McErlean AJ** (1968) *Zooplankton and environmental characteristics of the Patuxent River Estuary.* Chesapeake Science 9: 67-82
- Hillier LW, Reinke V, Green P, Hirst M, Marra MA, Waterston RH** (2009) *Massively parallel sequencing of the polyadenylated transcriptome of *C. elegans*.* Genome research 19(4): 657-666
- Hine PM** (2001) *Problems of applying risk analysis to aquatic organisms.* In: Proceedings of the international conference on risk analysis in aquatic animal health, France
- Hine PM, Wesney B** (1997) *Virus-like particles associated with cytopathology in the digestive gland epithelium of scallops *Pecten novaezelandiae* and *toheroa* Paphies Ventricosum.* Diseases of Aquatic Organisms 29: 197-204
- Hoffmann E, Bushek D, Ford S, Guo X, Haidvogel D, Hedgecock D et al.** (2009) *Understanding how disease and environment combine to structure resistance in estuarine bivalve populations.* Oceanography 22: 212-231
- Huang R, Gao H, Zhang L, Jia J, Liu X, Zheng P et al.** (2012) *Borna disease virus infection perturbs energy metabolites and amino acids in cultured human oligodendroglia cells.* PLoS One 7(9): e44665
- Hugues R, Towers G, Noursadeghi M** (2012) *Innate immune interferon responses to human immunodeficiency virus-1 interferon.* Reviews in Medical Virology 22(4): 257-266

I

- 
- Ibrahim N, Wicklind A, Janin A, Wiee MS** (2013) *Barrier to autointegration factor (BAF) inhibits vaccinia virus intermediate transcription in the absence of the viral B1 kinase*. *Virology* 444(1-2): 363-373
- Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS** (2009) *Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling*. *Science* 324: 218-223
- Itami T, Maeda M, Kondo M, Takahashi Y** (1999) *Primary culture of lymphoid organ cells and haemocytes of kumara shrimp, Penaeus japonicus*. *Methods in Cell Science* 21: 207-211

J

- 
- Jacquet S, Bratbak G** (2003) *Effects of ultraviolet radiation on marine virus-phytoplankton interactions*. *FEMS Microbiology Ecology* 44(3): 279-289
- Jones JB, Scotti PD, Dearing SC, Wesney B** (1996) *Virus-like particles associated with marine mussel mortalities in New Zealand*. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 143-149

K

- 
- Kang LJ, Choi YJ, Lee SG** (2013) *Stimulation of TRAF6/TAK1 degradation and inhibition of JNK/AP-1 signaling by ginsenoside Rg3 attenuates hepatitis B virus replication*. *The International Journal of Biochemistry & Cells Biology* 45: 2612-2621
- Kang YS, Kim YM, Park KI, Kim Cho S, Choi KS, Cho M** (2006) *Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (Ruditapes philippinarum) (bivalvia: mollusca) infected with Perkinsus sp.* *Developmental and Comparative Immunology* 30: 1119-1131
- Kasornchandra J, Khongpradit R, Ekpanithanpong U, Boonyaratpalin S** (1999) *Progress in the development of shrimp cell cultures in Thailand*. *Methods in Cell Science* 21: 231-235
- Kennedy CR** (1984) *The use of frequency distribution in an attempt to detect host mortality induced by infections of diplostomatid metacercariae*. *Parasitology* 89: 209-220

**Kennedy J, Flemer B, Jackson SA, Lejon DP, Morrissey JP, O'Gara F et al. (2010)** *Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism*. *Marine Drugs* 8(3): 608-28

**Kerns JA, Emerman M, Malik HS (2008)** *Positive selection and increased antiviral activity associated with the PARP-containing isoform of human zing-finger antiviral protein*. *PLoS Genetics* 4: E21

---

**L**

**La Peyre JF, Xue QG, Itoh N, Li Y, Cooper RK (2010)** *Serine protease inhibitors cvSI-1 potential role in the eastern oyster host defense against the protozoan parasite Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology* 34: 84-92

**La Peyre M, Casas SM, La Peyre J (2006)** *Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three Perkinsus species*. *Diseases of Aquatic Organisms* 71: 59-74

**Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A Nicolas JL (2006)** *Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster Crassostrea gigas, following bacterial infection with Vibrio aestuarianus strain 01/32*. *Microbes and Infection* 8(12-13): 2715-2724

**Laird PW (2010)** *Principles and challenges of genome wide DNA methylation analysis*. *Nature Reviews Genetics* 11: 191-203

**Lassalle G, de Montaudouin X, Soudant P, Paillard C (2007)** *Parasite co-infection of two sympatric bivalves, the Manila clam (Ruditapes philippinarum) and the cockles (Cerastoderma edule) along a latitudinal gradient*. *Aquatic Living Resources* 20: 33-42

**Lauckner G (1983)** *Diseases of molluscs: Bivalvia*. In Kinne O (ed) *Diseases of marine animals*. vol 2 Bivalvia to scaphopoda, p 520-615

**Lazure P, Dumas F (2008)** *An external-internal mode coupling for a 3D hydrodynamical model for applications at regional scale (MARS)*. *Advances in Water Resources* 31: 233-250

**Le Deuff RM, Lippart C, Renault T (1994a)** *Primary culture of Pacific oyster, Crassostrea gigas, heart cells*. *Journal of Tissue Culture Methods* 16: 1-6

**Le Deuff RM, Nicolas JL, Renault T, Cochenec N (1994b)** *Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 142(2): 69-72

- Le Marrec-Croq F** (1995) *Etablissement de cultures primaires de cellules de bivalves marins*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale
- Le Pennec G, Le Pennec M** (2001) *Acinar primary cell culture from the digestive gland of Pecten Maximus (L.): an original model for ecotoxicological purposes*. *Journal of Experimental Biology and Ecology* 259(2): 171-187
- Le Pennec G, Le Pennec M** (2003) *Induction of glutathione-S-transferase in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve Pecten maximus (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies*. *Aquatic Toxicology* 64(2): 131-142
- Le Treut Y** (1986) *La palourde. Anatomie – Biologie – Elevage – Pêche – Consommation – Inspection sanitaire*. Thèse de doctorat, Ecole nationale vétérinaire Nantes
- Lebel JM, Giard W, Favrel P, Boucaud-Camou E** (1996) *Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, Haliotis tuberculata*. *Biology of the Cell* 86: 67-72
- Lee YH, Lai CL, Hsieh SH, Shieh CC, Huang LM, Wu-Hsieh BA** (2013) *Influenza A virus induction of oxidative stress and MMP-9 is associated with severe lung pathology in a mouse model*. *Virus Research*, in press
- Lefèvre F, Lyard FH, Le Provost C, Schrama EJO** (2002) *FES99: a global tide finite element solution assimilating tide gauge and altimetric information*. *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology* 19: 1345-1356
- Leite RB, Afonso R, Cancela ML** (2004) *Perkinsus sp. infestation in carpet-shell clams, Ruditapes decussatus (L), along the Portuguese coast. Results from a 2-years survey*. *Aquaculture* 240: 39-53
- Li H, Durbin R** (2009) *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. *Bioinformatics* 25(14): 1754-1760
- Li R, Zhu H, Ruan J, Qian W, Fang X, Shi Z et al.** (2010) *De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing*. *Genome Research* 20(2):265-272
- Lipkin WI** (2009) *Microbe hunting in the 21<sup>st</sup> century*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 106(1): 6-7
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y Pong R et al.** (2012) *Comparison of next-generation sequencing systems*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 251364.

- Liu S, Vijayendran D, Bonning BC** (2011) *Next generation sequencing technologies for insect virus discovery*. *Viruses* 3: 1849-1869
- Liu X, Zhao Z, Liu W** (2013) *Insights into the roles of cyclophilin A during virus infection*. *Viruses* 5(1): 182-191
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta CT}$  method*. *Methods* 25: 402-408
- Lloyd RE** (2006) *Translational control by viral proteinases*. *Virus Research* 119(1): 76-88
- Lucas AP, Beninger G** (1985) *The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture*. *Aquaculture* 44: 187-200
- Lundgren M, Darnerud PO, Molin Y, Lilienthal H, Blomberg J, Ilbäck NG** (2007) *Viral infection and PDBE exposure interact on CYP gene expression and enzyme activities in the mouse liver*. *Toxicology* 242: 100-108

---

**M**

- Mackin JG, Owen HM, Collier A** (1950) *Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, Dermocystidium marinum n.sp. in Crassostrea virginica (Gmelin)*. *Science* 111: 328-329
- Maes P, Paillard C** (1992) *Effet du Vibrio P1, pathogène de Ruditapes philippinarum, sur d'autres espèces de bivalves. Les mollusques marins, Biologie et aquaculture*. IFREMER, actes de colloques 14: 141-148
- Maitre-Allain T** (1983) *Suivi d'un essai de repeuplement de palourdes dans l'étang de Thau*. Thèse de doctorat, Université de Montpellier
- Mardis ER** (2008) *Next-Generation DNA sequencing methods*. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 387-402
- Marie D, Partensky F, Vaulot D, Brussaard CPD** (1999) *Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples*. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean PN, Orfao A et al. (eds). *Current protocols in cytometry*. p. 11.11.11-11.11.15
- Mariette J, Escudié F, Allias N, Salin G, Noirot C, Thomas S et al.** (2012) *NG6: integrated next generation sequencing storage and processing environment*. *BMC Genomics* 13: 462

- Marin MG, Moschino V, Deppieri M, Luchetta L** (2003) *Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of T. philippinarum from the lagoon of Venice*. *Aquaculture* 219: 859-871
- Marley JE, McMichael AJ** (1991) *Principles behind practice. 6. Disease causation. The role of epidemiological evidence*. *Medical journal of Australia* 155: 95-101
- Martin-Gomez L, Villalba A, Abollo E** (2012) *Identification and expression of immune genes in the flat oyster Ostrea edulis in response to bonamiosis*. *Gene* 492: 81-93
- Martson DA, McElhinney LM, Ellis RJ, Horton DL, Wise EL, Leech SL et al.** (2013) *Next generation sequencing of viral RNA genomes*. *BMC Genomics* 14: 444
- Marzano CN, Liaci LS, Fianchini A, Gravina F, Mercurio M, Corriero G** (2003) *Distribution, persistence and change in the macrobenthos of the lagoon of Lesina (Apulia, southern Adriatic Sea)*. *Oceanologica Acta* 26: 57-66
- Matozzo V, Binelli A, Parolini M, Previato M, Masiero L, Finos L et al.** (2012) *Biomarker responses in the clam Ruditapes philippinarum and contamination levels in sediments from seaward and landward sites in the lagoon of Venice*. *Ecological Indicators* 19: 191-205
- Mayer SA, Baker SC, Lessard JL** (1986) *Tubulin: a factor necessary for the synthesis of both Sendai virus and vesicular stomatitis virus RNAs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83(15): 5405-5409
- Metzker ML** (2010) *Sequencing technologies - the next generation*. *Nature Review Genetics* 11: 31-46
- Meyers TR** (1984) *Marine bivalve mollusks as reservoirs of viral finfish pathogens: significance to marine and anadromous finfish aquaculture*. *Marine Fisheries Review* 46(3): 14-17
- Mialhe E, Boulo V, Grizel H** (1988) *Bivalve molluscs cell culture*. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 311-315
- Miao HZ, Tong SL, Xu B, Jiang M, Liu XY** (2000) *Multiplication of the shrimp baculovirus HHNBV with primary cell culture from lymphoid organ of Penaeus chinensis*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 16(2): 221-224
- Milan M, Coppe A, Reinhardt R, Cancela LM, Leite RB, Saavedra C et al.** (2011) *Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, Ruditapes philippinarum: genomic tools for environmental monitoring*. *BMC Genomics* 12: 234
- Miller LK, White E** (1998) *Apoptosis in virus infection*. *Virology* 8: 443-444

- Miszczak D, Stonska A, Golke A, Cymerys J** (2013) *Herpesviruses + survival strategies – latency and apoptosis*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67: 276-287
- Miyazaki T, Goto K, Kobayashi T, Kageyama T, Miyata M** (1999) *Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters Pinctada fucata martensii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 37: 1-12.
- Mizrachi E, Hefer C, Ranik M, Joubert F, Myburg A** (2010) *De novo assembled expressed gene catalog of a fast-growing eucalyptus tree produced by Illumina mRNA-seq*. *BMC Genomics* 11(1): 681
- Morga B, Renault T, Faury N, Arzul I** (2012) *New insights in flat oyster Ostrea edulis resistance against the parasite Bonamia ostrea*. *Fish and Shellfish Immunology* 32: 958-968
- Morga B, Renault T, Faury N, Arzul I** (2012) *New insights in flat oyster Ostrea edulis resistance against the parasite Bonamia ostrea*. *Fish & Shellfish Immunology* 32: 958-968
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B** (2008) *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. *Nature Methods* 5(7): 621-628

---

**N**

- Navas JI, Castillo MC, Vera P, Ruiz-Rico M** (1992) *Principal parasites observed in clams. Ruditapes decussatus (L.), Ruditapes philippinarum (Adams et Reeve), Venerupis pullastra (Montagu) and Venerupis aureus (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain)*. *Aquaculture* 107: 193-199
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM et al.** (2010) *Exome sequencing identifies the cause of mendelian disorder*. *Nature Genetics* 42: 30-35
- Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Bhunia AK** (2008) *WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic Bacillus species using CHO cell line*. *Journal of Microbiological Methods* 73(3): 211-215
- Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, Smith D, Kraus J, Alessi J et al.** (2006) *Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA*. *Science* 314: 1113-1118
- Noonan JP, Hofreiter M, Smith D, Priest JR, Rohland N, Rabeder G. et al.** (2005) *Genomic sequencing of Pleistocene cave bears*. *Science* 309: 597-599

**Novoa B, Figueras A** (2000) *Virus-like particles associated with mortalities of the carpet-shell clam Ruditapes decussatus*. Diseases of Aquatic Organisms 39: 147-149

---

O

**Odintsova NA, Belogortseva NI, Ermak AV, Molchanova VI, Luk'yanov PA** (1999) *Adhesive and growth properties of lectin from the ascidian Didemnum ternatanum on cultivated marine invertebrate cells*. Biochimica and Biophysica Acta 1448: 381-389

**Odintsova NA, Khomenko AV** (1991) *Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop, Mizuchopecten yessoensis (Bivalvia)*. Cytotechnology 6: 49-54

**Odintsova NA, Plotnikov SV, Karpenko AA** (2000) *Isolation and partial characterization of myogenic cells from mussel larvae in vitro*. Tissue Cell 32(5): 417-424

**Ordas MC, Ordas A, Beloso C, Figueras A** (2000) *Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with Perkinsus atlanticus*. Fish & Shellfish Immunology 10: 597-609

**Orsi JJ, Mecum WL** (1986) *Zooplankton distribution and abundance in the Sacramento-San Joaquin delta in relation to certain environmental factors*. Estuaries 9: 326-339

**Ossowski S, Schneeberger K, Clark RM, Lanz C, Warthmann N, Weigel D** (2008) *Sequencing of natural strains of Arabidopsis thaliana with short reads*. Genome Research 18(12): 2024-2033

**Owens L, Smith J** (1999) *Early attempts at production of prawn cell lines*. Methods in Cell Science 21: 207-211

**Ozsolak F, Milos PM** (2011) *RNA sequencing: advances, challenges and opportunities*. Nature Reviews Genetics 12: 87-98

---

P

**Paillard C** (2004) *A short review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, Ruditapes philippinarum and Ruditapes decussatus*. Aquatic Living Resources 17: 467-475

**Paillard C, Allan B, Oubella R** (2004) *Effect of temperature on defense parameter in Manila clam Ruditapes philippinarum challenged with Vibrio tapetis*. Diseases of Aquatic Organisms 59: 249-262



- Paillard C, Maes P, Mazurié J, Claude S, Marhic A, Le Pennec M (1997)** *Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of atlantic coast: Role of temperature in variation of prevalence.* 8th International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics, France. AEEMA publications, Paris p: 14031-14033
- Panjian L, Zhang K, Clifford W, Colwell Jr (2005)** *Comparison of validity between WST-1 and MTT test in bioceramic materials.* Key engineering materials 284: 585-588
- Paracha UZ, Fatima K, Algahtani M, Chaudhary A, Abuzenadah A, Damanhoury G et al. (2013)** *Oxidative stress and hepatitis C virus.* Virology Journal 10(1): 251
- Park KI, Choi KS (2001)** *Spatial distribution of the protozoan parasite Perkinsus sp. found in the Manila clams, Ruditapes philippinarum, in Korea.* Aquaculture 203: 9-22
- Park KI, Choi KS, Choi JW (1999)** *Epizootiology of Perkinsus sp. found in the Manila clam Ruditapes philippinarum in Komsoe bay, Korea.* Journal of Korean Fisheries Society 32: 303-309
- Park KI, Donaghy L, Kang HS, Hong HK, Kim YO, Choi KS (2012)** *Assessment of immune parameters of Manila clam Ruditapes philippinarum in different physiological conditions using flow cytometer.* Ocean Science Journal 47: 19-26
- Park PJ (2009)** *Chlp-seq: advantages and challenges of a maturing technology.* Nature Reviews Genetics 10: 669-680
- Paul-Pont I (2010)** *Sensibilité et adaptation de populations de bivalves marins soumis à des stress multiples : infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique.* Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1
- Paul-Pont I, de Montaudouin X, Gonzalez P, Jude F, Raymond N, Paillard C et al. (2010)** *Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve Ruditapes philippinarum in European populations.* Environmental Pollution 158: 3401-3410
- Payment P, Trudel M (1989)** *Manuel de techniques virologique.* Presses de l'université du Québec – AUPELF, Canada. 350 pages
- Paynter KT, Burreson FM (1991)** *Effects of Perkinsus marinus infection in the eastern oyster Crassostrea virginica. II Disease development and impact on growth rate at different salinities.* Journal of Shellfish Research 10: 425-431
- Pennec JP, Gallet M, Gioux M, Dorange G (2002)** *Cell culture of bivalves: tool for the study of the effects of environmental stressors.* Cellular and Molecular Biology 48(4): 351-358

- Pennec JP, Talarmin H, Droguet M, Girous-Metgès MA, Gioux M, Dorange G (2004)** *Characterization of the voltage-activated currents in cultured atrial myocytes isolated from the heart of the common oyster Crassostrea gigas*. Journal of Experimental Biology 207: 3935-3944
- Perkins FO, Wolf PH (1976)** *Fine structure of Marteilia sydneyi sp. n-haplosporidian pathogen of Australian oyster*. Journal of Parasitology 62: 528-538
- Peterhans E, Grob M, Bürge T, Zanoni R (1987)** *Virus-induced formation of reactive oxygen intermediates in phagocytic cells*. Free Radical Research Communication 3: 39-46
- Piñeiro G, Perelman S, Guerschman JP, Paruelo J (2008)** *How to evaluate models: Observed vs. predicted or predicted vs. observed? Ecological Modelling 216: 316-322*
- Pipe RK, Coles JA (1995)** *Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs*. Fish & Shellfish Immunology 5: 581-595
- Pipe RK, Porter C, Livingstone DR (1994)** *Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel Mytilus edulis*. Fish & Shellfish Immunology 3: 221-233
- Plus M, Dalloyau S, Trut G, Auby I, de Montaudouin X, Emery E et al. (2010)** *Long-term evolution (1988-2008) of Zostera spp. meadows in Arcachon Bay (Bay of Biscay)*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 87: 357-366
- Plus M, Dumas F, Stanisière JY, Maurer D (2009)** *Hydrodynamic characterization of the Arcachon Bay, using model-derived descriptors*. Continental Shelf Research 29: 1008-1013
- Poinar HN, Schwarz C, Qi J, Shapiro B, Macphee RD, Buigues B et al. (2006)** *Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA*. Science 311: 392-394
- Ponurovsky SK, Yakovlev YM (1992)** *The reproductive biology of the Japanese littleneck, Tapes philippinarum (A. Adams and Reeve, 1850) (Bivalvia: Veneridae)*. Journal of Shellfish Research 11: 265-277
- Popovsky J, Gallet F, Pautrizel F (1999)** *Etat des suivis et des évaluations des stocks de coquillages en élevages et des gisements naturels dans les bassins conchylicoles de la façade Aglia*. Rapport Observatoire des pêches et des cultures marines du golfe de Gascogne

## Q

- 
- Queiroga FR, Marques-Santos LF, Hégaret H, Soudant P, Farias ND, Schlindwein AD et al. (2013)** *Immunological responses of the mangrove oysters Crassostrea gasar naturally infected by*

Perkinsus sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). Fish & Shellfish Immunology 35(2): 319-327

**R**

---

- Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N** (2012) *Applications of next-generation sequencing technologies in virology*. Journal of General Virology 93: 1853-1868
- Ragone-Calvo LM, Dungan CF, Roberson BS, Bureson EM** (2003) *Systematic evaluation of factors controlling Perkinsus marinus transmission dynamics in lower Chesapeake Bay*. Diseases of Aquatic Organisms 56: 75-86
- Rajawat J, Mir H, Begim R** (2011) *Differential role of poly (ADP-ribose) polymerase in D. discoideum growth and development*. BMC Developmental Biology 11: 14
- Rank J, Jensen K** (2003) *Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel Mytilus edulis*. Ecotoxicological and Environmental Safety 54: 323-329
- Rasmussen LPD** (1986) *Virus-associated granulocytomas in the marine mussel Mytilus edulis, from three sites in Denmark*. Journal of Invertebrate Pathology 48: 117-123
- Ray SM** (1952) *A culture technique for the diagnosis of infection with Dermocystidium marinum Mackin, Owen, and Collier in oysters*. Science 116: 360-361
- Ray SM** (1966) *A review of the culture method of detecting Dermocystidium marinum with suggested modifications and precautions*. Proceedings of the National Shellfish Association 54: 55-69
- Regan AD, Shraybman R, Cohen RD, Whittaker GR** (2008) *Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses*. Veterinary Microbiology 132(3-4): 235-248
- Reid H, Soudant P, Lambert C, Paillard C, Birkbeck TH** (2003) *Salinity effect on immune parameters of Ruditapes philippinarum challenged with Vibrio tapetis*. Diseases of Aquatic Organisms 56: 249-258
- Renault T** (1996) *Appearance and spread of diseases among bivalves molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade*. Revue Scientifique et Technique (International office of epizootics) 15(2): 551-561

- Renault T, Flaujac G, Le Deuff RM** (1995) *Isolation and culture of heart cells from the European flat oyster, Ostrea edulis*. *Methods in Cell Culture* 17: 199-205
- Renault T, Novoa B** (2004) *Viruses infecting bivalve molluscs*. *Aquatic Living Resources* 17: 397-409
- REPAR-Réseau pesticides bassin d’Arcachon** (2012) *Rapport d’étude*. Syndicat intercommunal du bassin d’Arcachon 73p
- Richardson P** (2010) *Special issue: next-generation DNA sequencing*. *Genes* 1(3): 385-387
- Rinkevich B** (1999) *Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements*. *Journal of Biotechnology* 70: 133-153
- Rinkevich B** (2005) *Marine invertebrate cell cultures: New millennium trends*. *Marine biotechnology* 7: 429-439
- Rivers TM** (1937) *Viruses and Koch's postulates*. *Journal of Bacteriology* 33(1): 1
- Robert R, Deltreil JP** (1990) *Elevage de la palourde japonaise Ruditapes philippinarum dans le bassin d'Arcachon, bilan des dix dernières années et perspectives de développement*. Rapport IFREMER
- Robert R, Guillocheau N, Collos Y** (1987) *Hydrobiological parameters during an annual cycle in the Arcachon Basin*. *Marine Biology* 95: 631-640
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK** (2010) *edgeR : a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. *Bioinformatics* 26: 139-140
- Robledo Y, Cajaraville MP** (1997) *Isolation and morphofunctional characterization of mussel digestive gland cells in vitro*. *European Journal of Cell Biology* 72: 362-369
- Romade JL, Luz Vilarño L, Beaz R, Rodriguez JM, Diaz S, Villalba A et al.** (2007) *Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (Cerastoderma edule)*. *Journal of Invertebrate Pathology* 94(2): 95-101
- Ross Ellington W** (1993) *Studies of intracellular pH regulation in cardiac myocytes from the marine bivalve mollusk, Mercenaria campechiensis*. *The Biological Bulletin* 184: 209-215
- Roughley TC** (1926) *An investigation of the cause of oyster mortality on the Georges river, New south wales, 1924-25*. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 51: 446-491
- Rybarczyk H, Elkaim B** (2003) *An analysis of the trophic network of a macrotidal estuary: the Seine estuary (Eastern Channel, Normandy, France)*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 58: 775-791

- 
- Samain JF, McCombie H** (2008) *Summer mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas. The Morest project*. Versailles: Quae ed 379p.
- Samuel CE** (2001) *Antiviral actions of interferons*. *Clinical Microbiology Reviews* 14(4): 778-809
- Sánchez EG, Quintas A, Nogal M, Castello A, Revilla Y** (2013) *African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis*. *Virus Research* 173: 58-75
- Sanchez F, Caill-Milly N, De Casamajor MN, Lissardy M** (2013) *Campagne d'évaluation du stock de palourdes du bassin d'Arcachon. Année 2012*. Rapport IFREMER
- Sanchez F, Caill-Milly N, Lissardy M, de Casamajor MN, Morandeau G** (2010) *Campagne d'évaluation du stock de palourdes du bassin d'Arcachon. Année 2010*. RAPPORT IFREMER
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5463-5467
- Saulnier D, Reynaud Y, Arzul I, Miossec F, Le Roux F, Goarant C** (2007) *Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole: quelques scénarios illustrés d'exemples*. *INRA Production animale* 20(3): 207-212
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A** (2010) *A window into third-generation sequencing*. *Human Molecular Genetics* 19(2): 227-240
- Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T** (2011a) *Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the pacific oyster Crassostrea gigas: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples*. *Virus Research* 155(1): 28-34
- Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pépin JF** (2011b) *Experimental infection of Pacific oyster Crassostrea gigas spat by ostreid herpes virus 1: demonstration of oyster spat susceptibility*. *Veterinary Research* 42(1): 27
- Schorberg K, Shoemaker CJ, Dube D, Abshire MY, Delos SE, Bouton et al.** (2009)  *$\alpha_5\beta_1$ -Integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(19): 8003-8006
- Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M, Birney E** (2012) *Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels*. *Bioinformatics* 28(8): 1086-1092

- Schuster SC** (2008) *Next generation sequencing transforms today's biology*. *Nature Methods* 5(1): 16-18
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K** (2011) *Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients*. *Nature Reviews Cancer* 11: 426-437
- Shendure J, Ji H** (2008) *Next-generation DNA sequencing*. *Nature Biotechnology* 26: 1135-1145
- Shimizu C, Shike H, Klimpel KR, Burns JC** (2001) *Hemolymph analysis and evaluation of newly formulated media for culture of shrimp cells (Penaeus stylirostris)*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* 36(6): 322-329
- Silva da Costa L, Pereira da Silva AP, Da Poian AT, El-Bacha T** (2012) *Mitochondrial bioenergetic alterations in mouse neuroblastoma cells infected with Sindbis virus: implications to viral replication and neuronal death*. *PLoS One* 7(4): e33871
- Singh BK, Chattopadhyay J, Sinha S** (2004) *The role of virus infection in a simple phytoplankton zooplankton system*. *Journal of Theoretical Biology* 231(2): 153-166
- Smith DR, Quinlan AR, Peckham HE, Makowsky K, Tao W, Woolf B et al.** (2008) *Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies*. *Genome Research* 18(10): 1638-1642
- Snieszko SF** (1974) *The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *Journal of Fish Biology* 6: 197-208
- SOGREAH** (2001) *bassin d'Arcachon - Amélioration de l'hydraulique réflexion sur la programmation des travaux*. Report No. n°71 1027 R, SOGREAH - Syndicat Intercommunal du bassin d'Arcachon
- Soldatov AA, Gostyukhina OL, Golovina IV** (2007) *Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve Mytilus galloprovincialis Lam. under normal and oxidative-stress condition: A review*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43(5): 556-562
- Soudant P, Chu FL, Volety A** (2013) *Host-Parasite Interactions: Marine Bivalve Molluscs and Protozoan parasites, Perkinsus species*. *Journal of Invertebrate Pathology* 114(2): 196-216
- Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A et al.** (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
- Stoermer KA, Morrison TE** (2011) *Complement and viral pathogenesis*. *Virology* 411(2): 362-372

**Stukelj M, Toplak I, Svete AN** (2013) *Blood antioxidant enzymes (SOD, GPX), biochemical and haematological parameters in pigs naturally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Polish Journal of Veterinary Sciences 16(2): 369-376

**Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M et al.** (2008) *A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome*. Science 321(5891): 956-960

---

**T**

**Takeuchi Y, Yamamoto S, Odo S** (1994-a) *Primary and secondary cultures of larval cells of Pacific oyster, Crassostrea gigas*. Journal of Marine Biotechnology 1: 171-175

**Takeuchi Y, Yamamoto S, Odo S** (1994-b) *Primary culture of larval cells of the mussel, Mytilus edulis galloprovincialis*. Journal of Marine Biotechnology 2: 51-54

**Talarmin H, Droguet M, Pennec JP, Schröder HC, Muller WEG, Gioux M et al.** (2008) *Effects of a phycotoxin, okadaic acid, on oyster heart cell survival*. Toxicological and Environmental Chemistry 90(1): 153-168

**Tamura T** (1970) *Marine aquaculture*. National Science Foundation, Washington DC

**Tan J, Lancaster M, Hyatt A, Van Driel R, Wong F, Warner S** (2008) *Purification of a herpes-like virus from abalone (Haliotis spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy*. Journal of Virological Methods 149(2): 338-341

**Tang P, Chiu C** (2010) *Metagenomics for the discovery of novel human viruses*. Future Microbiology 5: 177-189

**Tanguy A, Bierne N, Saavedra C, Pina B, Bachère E, Kube M et al.** (2008) *Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species, development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution*. Gene 408: 27-36

**Tautz D, Ellegren H, Weigel D** (2010) *Next-generation molecular ecology*. Molecular Ecology 19: 1-3

**Teodoro JG, Branton PE** (1997) *Regulation of apoptosis by viral gene products*. Journal of Virology 71(3): 1739-1746

**Thompson RJ, Bayne CJ, Moore MN, Carefoot TH** (1978) *Haemolymph volume, changes in the biochemical composition of the blood, and cytological responses of the digestive cells in Mytilus*

californianus Conrad, induced by nutritional, thermal and exposure stress. *Journal of Comparative Physiology* 127: 287-298

**Thornton B, McEntee ID, Griffiths B (1985)** Production of herpes simplex virus from MRC-5 grown in a glass bead culture system. *Developments in Biological Standardization* 60: 475-481

**Toma B, Thiry E (2003)** Qu'est-ce qu'une maladie émergente. *Epidémiologie et santé animale* 44: 1-11

**Tomaru Y, Mizumoto H, Nagasaki K (2009)** Virus resistance in the toxic bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to single-stranded RNA virus infection. *Environmental Microbiology* 11(11): 2915-2923

**Tung WH, Hsieh HL, Lee IT, Yang CM (2011)** Enterovirus 71 induces integrin  $\beta 1$ /EGFR-Rac1-dependent oxidative stress in SK-N-SH cells: role of HO-1/CO in viral replication. *Journal of Cellular Physiology* 226(11): 3316-3329

**Turcatti G, Romieu A, Fedurco M, Tairi AP (2008)** A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Research* 36: 25

U

---

**Umasuthan N, Bathige SD, Revathy KS, Lee Y, Whang I, Choi CY et al. (2012)** A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: Comparative structural- and expressional-analysis with copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities. *Fish & Shellfish Immunology* 3(4): 753-765

**Unterholzner L (2013)** The interferon response to intracellular DNA, why so many receptors ? *Immunobiology* 218: 1312-1321

V

---

**Van de Sandt CE, Kreijtz JHCM, Rimmelzwaan GF (2012)** Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses* 4(9): 1438-1476

**Van der Meer Y, van Tol H, Locker JK, Snijder EJ (1998)** ORF1a-encoded replicase subunits are involved in the membrane association of the artemivirus replication complex. *Journal of Virology* 72(8): 6689-6698



- Ventoso I, Sanz MA, Molino S, Berlanga JJ, Carrasco L, Esteban M** (2006) *Translational resistance of the late alphavirus mRNA to eIF2 alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR*. *Genes and Development* 20(1): 87-100
- Villalba A, Casas SM, Lopez C, Carballal MJ** (2005) *Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality*. *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 257-267
- Villalba A, Reece KS, Ordas MC, Casas SM, Figueras A** (2004) *Perkinsosis in molluscs: A review*. *Aquatic Living Resources* 17: 411-432
- Villarreal LP** (2004) *Are Viruses Alive?* *Scientific American* 291: 100-105
- Vincent D** (2002) *Dynamique et nutrition du zooplancton (bassin d'Arcachon) : flux de carbone et d'azote associés. Conséquences sur le pool nutritif et sur les organismes*. Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée
- 
- W**
- Wang A, Chapman P, Chen L, Stobbs LW, Brown DCW, Brandle JE** (2005) *A comparative survey, by expressed sequence tag analysis, of genes expressed in peach leaves infected with Plum pox virus (PPV) and free from PPV*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 410-419
- Wang J, Wang W, Li R, Li Y, Tian G, Goodman L et al.** (2008) *The diploid genome sequence of an Asian individual*. *Nature* 456(7218): 60-65
- Wang S, Peatman E, Liu H, Bushek D, Ford SE, Kucuktas H et al.** (2010d) *Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge*. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 921-929
- Wang X, Tang C, Deng L, Cai G, Liu X, Liu B et al.** (2010c) *Characterization of a pathogenesis-related traumatin-like protein gene *TaPRS* from wheat induce by stripe rust fungus*. *Physiologia Plantarum* 139(1): 27-38
- Wang XW, Luan JB, Li JM, Bao YY, Zhang CX, Liu SS** (2010a) *De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development*. *BMC Genomics* 11(1): 400

- Wang Z, Fang B, Chen J, Zhang X, Luo Z, Huang L et al.** (2010b) *De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweetpotato (Ipomoea batatas)*. BMC Genomics 11(1): 726
- Watson JO, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM** (1987) *Control of cell proliferation*. In : Molecular biology of the gene, eds The Benjamin/Cummings Publishing Company 1059-1108
- Wen CM, Kou GH, Chen SN** (1993-a) *Cultivation of cells from the heart of the hard clam Meretrix lusoria (Röding)*. Journal of Tissue Culture Methods 15: 123-130
- Wen CM, Kou GH, Chen SN** (1993-b) *Establishment of cell lines from the pacific oyster*. In Vitro Cellular and Developmental Biology 29: 901-903
- Wiebe MS, Traktman P** (2007) *Poxviral B1 kinase overcomes barrier to autointegration factor a host defense against virus replication*. Cell Host & Microbe 1: 187-197
- Wolf PH** (1972) *Occurrence of a haplosporidian in Sydney rock oysters (Crassostrea commercialis) from Moreton bay, Queensland, Australia*. Journal of Invertebrate Pathology 19: 416-417
- Wolff WJ** (1973) *The estuary as a habitat: an analysis of data on the soft-bottom macrofauna of the estuarine area of the rivers Rhine, Meuse, and Scheldt*. Zoologische Verhandelingen 126: 1-242
- Wool IG** (1996) *Extraribosomal functions of ribosomal proteins*. Trends in Biochemical sciences 21: 164-165

X

- 
- Xing J, Lin T, Zhan W** (2008) *Variations of enzyme activities in the haemocytes of scallop Chlamys farreri after infection with the acute virus necrobiotic virus (AVNV)*. Fish & Shellfish Immunology 25(6): 847-852
- Xu Yi, Zhou W, Zhou Y, Wu J, Zhou X** (2012) *Transcriptome and comparative gene expression analysis of Sogatella furcifera (Horvath) in response to southern rice black-streaked dwarf virus*. PLoS One 7(4) e36238
- Xue QG, Itoh N, Schey KL, Cooper RK, La Peyre JF** (2009) *Evidence indicating the existence of a novel family of serine protease inhibitors that may be involved in marine invertebrate immunity*. Fish and Shellfish Immunology 27: 250-259

- 
- Yoshino TP, Bickham U, Bayne CJ** (2013) *Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines*. Canadian Journal of Zoology 91: 391-404
- Ysebaert T, Herman PMJ** (2002) *Spatial and temporal variation in benthic macrofauna and relationships with environmental variables in an estuarine, intertidal soft-sediment environment*. Marine Ecology Progress Series 244: 105-124
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ** (2002) *Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependant cell death by apoptosis-inducing factors*. Science 12: 259-263

- 
- Zerbino DR, Birney E** (2008) *Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graph*. Genome Research 18: 821-829
- Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G** (2011) *The impact of next-generation sequencing on genomics*. Journal of Genetics and Genomics 38(3): 95-109
- Zheng Y, Fu XD, Ou JH** (2005) *Suppression of hepatitis B virus replication by SRPK1 and SRPK2 via a pathway independent of the phosphorylation of the viral core protein*. Virology 342: 150-158
- Zhou LZH, Jonhson AP, Rando TA** (2001) *NF- $\kappa$ B and AP-1 mediate transcriptional response to oxidative stress in skeletal muscle tissue*. Free Radical Biology & Medicine Journal 31: 1405-1416
- Zhou X, Michal JJ, Zhang L, Ding B, Lunney JK, Liu B et al.** (2013) *Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense*. International Journal of Biological Sciences 9(2): 200-208
- Zhu Y, Chen G, Lv F, Wang X, Ji X, Xu Y et al.** (2011) *Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 108(38): 15834-15839
- Zimmermann** (2003) *The double life of ribosomal proteins*. Cell 115: 130-132



## Résumé

Seconde espèce de mollusque bivalve la plus exploitée au monde, la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* représente un intérêt économique majeur. A l'échelle du bassin d'Arcachon, la maladie du muscle marron ou BMD (pour Brown Muscle Disease), pathologie émergente découverte en 2005 inquiète tout particulièrement le secteur de la pêche. Cette pathologie affecte le muscle adducteur postérieur de la palourde et perturbe l'ouverture-fermeture des valves. Cette perturbation entraîne la remontée des individus à la surface du sédiment et la mort.

Ces travaux de thèse ont porté d'une part sur l'épizootiologie de la maladie et son impact sur l'hôte et d'autre part sur l'identification de l'agent responsable de la maladie.

Une étude sur la distribution des palourdes dans le bassin d'Arcachon (littoral Atlantique français) montre que la prévalence de la BMD a diminué entre 2010 et 2012. Toutefois cette baisse ne concerne pas les individus ayant atteint la taille légale de pêche (> 35mm). De plus, la maladie semble apparaître chez des individus de plus en plus petit et risque donc d'accroître la mortalité aux plus jeunes stades. L'analyse des facteurs environnementaux impliqués dans la distribution de la maladie souligne la corrélation entre la prévalence de la BMD et un hydrodynamisme relativement « calme ».

La BMD affecte tout particulièrement le métabolisme énergétique de l'hôte, les mécanismes de réponse au stress oxydant et également le système immunitaire. De nombreuses fonctions sont surexprimées chez les hôtes malades mais d'autres voies comme celle de l'apoptose sont régulées négativement par l'agent infectieux.

Si l'origine virale est maintenant une hypothèse solide (microscopie électronique, transcriptomique), la nature exacte de l'agent étiologique (famille virale) ne peut à ce jour être déterminée avec certitude. Des particules virales ont bien été observées dans les tissus malades mais pas dans les tissus sains, et ont pu être purifiées sur gradient de sucrose. Toutefois, les essais pour provoquer la maladie chez des individus sains ont échoué.

**Mots-clés : *Venerupis philippinarum*, maladie du muscle marron (BMD), virus, épizootiologie, parasitisme, *Perkinsus*, réponse immunitaire**

## Abstract

The Manila clam *Venerupis philippinarum* is the second most exploited mollusk bivalve in the world and represents a major economic interest. At the scale of Arcachon bay, the Brown Muscle Disease or BMD, an emergent pathology discovered in 2005, concerns fishing activity. This pathology affects the posterior adductor muscle of the clam and disrupts the valve opening and closing process. It induces the migration of clams to the surface and their death.

This thesis concerns on the one hand the epizootiology of the disease and its impact on host and on the other hand the identification of the causal agent of the disease.

A study of the clam distribution in Arcachon bay (French Atlantic coast) shows that prevalence of BMD decreased between 2010 and 2012. However this decrease doesn't affect clams of the legal harvesting size (> 35mm). Furthermore, the disease seems to appear in individuals with increasingly smaller size and thus risks to increase mortality in the youngest stages. The analysis of the environmental factors that are involved in the disease distribution highlights the correlation between prevalence of the BMD and relatively "quiet" hydrodynamism.

BMD particularly affects the energy metabolism of the host, the oxidative stress response mechanisms and the immune system.

Many functions are up-regulated in the BMD-affected hosts but other ways, as the apoptosis, are down-regulated by the infectious agent.

Although viral origin of BMD is now a convincing hypothesis (electronic microscopy, transcriptomic), the nature of the etiological agent (viral family) cannot so far be determined with certainty. Viral particles were observed in tissues of BMD-diseased hosts but not in tissues of healthy host. They have been purified on sucrose gradient. However, the attempt to provoke the disease in healthy individuals failed.

**Keywords: *Venerupis philippinarum*, Brown Muscle Disease (BMD), virus, epizootiology, parasitism, *Perkinsus*, immune response**

