



HAL
open science

Étude multifactorielle de la vibriose chez l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*: bases génomiques et physiologiques de la survie aux mortalités estivales chez l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*

Marion Cardinaud

► **To cite this version:**

Marion Cardinaud. Étude multifactorielle de la vibriose chez l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*: bases génomiques et physiologiques de la survie aux mortalités estivales chez l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*. Zoologie des invertébrés. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0062 . tel-01124110

HAL Id: tel-01124110

<https://theses.hal.science/tel-01124110v1>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Océanologie Biologique
École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Marion Cardinaud

Préparée au Laboratoire des Sciences de
l'Environnement MARin - UMR 6539

Etude multifactorielle
de la vibriose
chez l'ormeau européen
Haliotis tuberculata

Bases génomiques et physiologiques de
la survie aux mortalités estivales chez
l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*

Thèse soutenue le 29 mars 2013

devant le jury composé de :

Stéphanie AUZOUX-BORDENAVE, rapporteur 1

MCF HDR / UMR BOREA, Station de Biologie Marine du Muséum
national d'Histoire naturelle, Concarneau, France

Jerome LA PEYRE, rapporteur 2

Associate Professor / School of Animal Sciences, LSU AgCenter,
Baton Rouge, Louisiana, USA

Jacques CLAVIER, examinateur 1

Professeur / LEMAR, UMR6539, IUEM, UBO, Plouzané, France

Julien DE LORGERIL, examinateur 2

Cadre Ifremer / "Ecologie des Systèmes Marins Côtiers" Ecosym,
UMR 5119, Montpellier, France

Christine PAILLARD, Directrice de thèse

DR CNRS / LEMAR, UMR6539, IUEM, UBO, Plouzané, France

Dario MORAGA, Directeur scientifique

MCF HDR / LEMAR, UMR6539, IUEM, UBO, Plouzané, France

A mon fils Issa

Et à toutes les personnes qui ont dit ou pensé que la thèse est une école de la vie

Remerciements

Je tiens à remercier, dans un premier temps, l'équipe dirigeante du laboratoire LEMAR et de l'école doctorale d'avoir permis la réalisation et le financement salarial de cette thèse. Je remercie également M. Pascal Gente et M. Yves-Marie Paulet pour leur écoute et l'attention qu'ils ont su porter à la réussite de ce projet de thèse. Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Christine Paillard, qui a dirigé cette thèse avec patience, chaleur humaine et compréhension ; et Dario Moraga pour son soutien infailible et pour avoir cru en mes capacités. Ma reconnaissance s'adresse également à Sylvain Huchette d'avoir toujours su veiller à me fournir le matériel biologique nécessaire aux expérimentations.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. J'en profite pour renouveler mon extrême reconnaissance envers Jerome La Peyre pour les corrections linguistiques de l'article 2. Merci, très sincèrement, au Pr. Jacques Clavier, de m'avoir tant enseigné d'un point de vue universitaire et humain.

J'adresse mes remerciements à toutes les aides du laboratoire qui m'ont permis de gagner du temps et de ne pas être perdue dans les obligations administratives et logistiques. Merci donc à Fabienne Guérard pour avoir partagé avec moi son savoir biochimique, à Anne-Sophie et Gene pour leur patience, à Carole Capitaine pour son aide technique, à Alain Le Mercier, Alain Marhic, Philippe Miner, Anne Donval pour leur aide précieuse en informatique et logistique.

J'exprime ma reconnaissance à Elisabeth Bondu dont le bureau m'a toujours été ouvert et Jacques Baron qui a fait confiance à mon enthousiasme pour l'enseignement.

Je remercie également ces collaboratrices que je n'oublierai pas, pour leur attention et leurs encouragements, Carolyn Friedman qui reste pour moi l'une des femmes modèles dans ce milieu, et Valérie Stiger-Pouvreau.

Finalement, je remercie, de tout cœur, toutes ces petites mains qui m'ont aidée dans les expériences diverses et variées, tous ces étudiants qui ont su égayer les salles de laboratoires pendant les quelques mois de leur présence. Merci donc à Emilie Baugin, Coralie Allain, Thomas Guérin, Adeodat Ibouldot, Charlotte Balière, Clémence Royer, Antoine Dujon et Clément Offret.

De tout mon cœur, merci à mes parents – avec ce que vous avez pu et su donner, j’en suis arrivée là ; sans vous, ce n’était pas possible. Aujourd’hui, j’espère vous montrer ma reconnaissance, et que je sais aussi me reposer, profiter de ce qui m’est offert et continuer d’avancer. Je crois que plus rien ne m’arrête maintenant. Merci à ma famille d’avoir été en soutien et de ne jamais avoir douté.

Merci à mes amis, ceux qui ont partagé avec moi mes moments de réussite, de grandes joies, mes doutes etc... Chacun de vous m’a apporté. Merci donc à Eric – les sms encourageants, le réconfort, et la découverte du croque saumon, des parties de jeux vidéo, de la tequila, ... ; merci à Maria – croire en moi m’a aidé et te voir si déterminée m’a convaincu d’avancer ; merci à son grand mari, Vlad – pour l’attention portée aux questions informatiques bidons, pour avoir accepté ma présence à vos côtés quand j’en avais besoin ; merci à Claire – partie trop loin ma Claire, pour ton côté direct qui m’ont appris que quand on veut quelque chose, on n’y va pas par quatre chemins... et oui, pour les pauses cafés aussi, silencieuses et reposantes ou joyeuses et divertissantes ; merci à Vivi – parce que sans tes expressions, ma vie aurait été différente, c’est sûr, et parce que grâce à toi j’ai eu de magnifiques fou-rires ; merci à Katia – mais où as-tu disparue ? je n’oublie jamais les gens qui ont su être là sans juger, juste avec bienveillance ; merci à Guillaume – je me souviens d’un temps où nous nous voyions tous les jours ou presque... merci pour ta cheminée et les barbecues, pour ta détermination et ton soutien, et pour toujours me faire rire quand on se voit ; merci à Amadou, Yi, Isa, Anne-C, Ali, Odile (oui oui merci Odile!) ; merci à l’équipe MerScidoc ; et à tous ceux que j’ai croisés à l’IUEM entre deux manipes, entre deux publis, souvent à toute vitesse, pour ces petits riens qui égayent une journée : l’équipe des microbes : Joonas, Grégoire, Julien, et les autres : Maud, Edouard, Manuel, Rossana, Marie, Camille, Tony, ... et tous ceux que j’oublie.

Merci aussi à ceux qui m’ont appris, pendant cette thèse, que la valeur de l’humain a plus d’importance que le diplôme, le prestige et le paraître.

Merci ...

Sommaire

Contexte général	15
-------------------------	-----------

Rappels bibliographiques	21
---------------------------------	-----------

I. Les bactéries appartenant au clade Harveyi

A- Taxonomie, espèces et biologie.....	22
B- Pathogénicité, virulence et maladies induites	25
C- Identification et détection des espèces pathogènes du clade <i>Harveyi</i>	31
D- Facteurs de virulence du clade <i>Harveyi</i>	34
E- Solutions de lutte développées pour l'aquaculture	46

*II. L'ormeau européen *Haliotis tuberculata**

A- Généralités.....	49
B- Biologie et répartition de l'ormeau européen	49
C- Les maladies des ormeaux et agents pathogènes.....	57
E- Immunité et système immunitaire.....	61

III. Les vibrioses chez les ormeaux

A- Les cas de vibrioses entre des espèces du clade <i>Harveyi</i> et des espèces d'ormeaux dans le monde	72
B- La vibriose chez l'ormeau européen	74

Objectifs	81
------------------	-----------

Résultats

83

Premier chapitre : Réponse de l'ormeau européen à la vibriose et aux conditions contraignantes, par approche transcriptomique et immunologique

A- Introduction84

B- Résultats

Article 1 : Gene expression patterns of European abalone during successive infections by the bacterial *Vibrio harveyi* 87

Article 2 : Effects of handling and air exposure on transcriptional and immune responses, and susceptibility to vibriosis in European abalone *Haliotis tuberculata* 96

B- Discussion générale.....117

Second chapitre : Cycle infectieux de *Vibrio harveyi* chez l'ormeau européen, température et facteurs de virulence potentiels

A- Introduction.....121

C- Résultats

Article 3 : Portal of entry and infection dynamics during the earlier stages of vibriosis in European abalone *H. tuberculata* 123

Résultats complémentaires : Température et virulence de *V. harveyi*..... 139

Résultats complémentaires : Facteurs de virulence de la souche ORM4, pathogène de l'ormeau européen 141

D- Discussion générale.....145

Troisième chapitre : Interaction *V. harveyi* – Ormeau européen - Réponse immunitaire, découplage des facteurs de déclenchement, et stades précoces de l'infection

A- Introduction.....155

B- Résultats

Article 4 : Cellular and molecular responses of hemocytes in European abalone *Haliotis tuberculata* during the earlier stages of vibriosis 157

Résultats complémentaires : analyse préliminaire du découplage des facteurs température, maturité sexuelle et l'exposition à *V. harveyi* sur le métabolisme branchial et la réponse immunitaire 178

C- Discussion générale191

Conclusion générale et perspectives

209

Liste des figures

Figure 1 : Schéma conceptuel des différentes interactions entre organismes	16
Figure 2 : Schéma des processus de rencontre et de compatibilité dans les systèmes hôte-parasites	18
Figure 3 : Schéma conceptuel des interactions hôte-parasite-environnement	19
Figure 4 : Emergence et déclenchement de la vibriose de l'ormeau européen en fonction de la température	20
Figure 5 : Arbre phylogénétique des espèces <i>Vibrio</i>	23
Figure 6 : Arbre phylogénétique basé sur le séquençage de neuf gènes chez les « Vibrios »	24
Figure 7 : Postulats de la pathogenèse énoncés par Robert Koch en 1890, puis ceux publiés par Casadevall et Pirofski en 2003 et les postulats moléculaires de Falkow en 1988	25
Figure 8 : Modèle conceptuel de la pathogenèse proposé par Casadevall et Pirofski en 2003	26
Figure 9 : Photographies de crevettes <i>Penaeus monodon</i> atteintes de vibriose lumineuse	29
Figure 10 : Schéma simplifié de la structure d'un flagelle chez les bactéries gram négatif et photographies de flagelles chez des espèces <i>Vibrio</i> du clade <i>Harveyi</i>	36
Figure 11 : « Quorum sensing » chez <i>Vibrio harveyi</i> et cascade d'activation ou d'inhibition du facteur transcriptionnel LuxR	43
Figure 12 : Synthèse de l'impact du « Quorum sensing » sur l'expression de facteur de virulence chez <i>V. harveyi</i>	43
Figure 13 : Les premières étapes hypothétiques de l'infection induites par les bactéries du clade <i>Harveyi</i> et facteurs de virulence associés	45
Figure 14 : Anatomie de l'ormeau européen <i>Haliotis tuberculata</i>	50
Figure 15 : Distribution géographique et habitat de l'espèce <i>Haliotis tuberculata</i>	53
Figure 16 : Etapes du développement des ormeaux	56
Figure 17 : Exemples de maladies chez l'ormeau européen <i>Haliotis tuberculata</i>	58
Figure 18 : Schéma hypothétique des étapes du processus de phagocytose, chez les ormeaux	62
Figure 19 : Schéma simplifié de l'activation des voies de transduction du signal par le facteur TNF chez l'Homme	65
Figure 20 : Schéma de l'activation de la phénoloxdase et de la formation de mélanine chez les invertébrés	70

Figure 21 : Mortalités massives d'ormeaux européens observées en milieu naturel et reproduites au laboratoire	75
Figure 22 : Schéma conceptuel de l'interaction entre Ormeau européen – <i>Vibrio harveyi</i> – Environnement	76
Figure 23 : Observations microscopiques de tissus d'ormeaux moribonds, infectés par la souche ORM4-GFP de <i>Vibrio harveyi</i>	79
Figure 24 : Schéma des différentes banques soustractives réalisées chez <i>Haliotis tuberculata</i>	85
Figure 25 : Mortalités d'ormeaux observées dans les 10 jours suivant le transfert d'ormeaux au laboratoire	86
Figure 26: Simplified experimental design to determine the effects of handling or air exposure stress on the susceptibility of abalone <i>Haliotis tuberculata</i> to <i>Vibrio harveyi</i> .	102
Figure 27: Fluctuations of hemocytes parameters in <i>Haliotis tuberculata</i> following handling or air exposure.	103
Figure 28: NormFinder analysis of expression stability of gene encoding ribosomal RNA 18S, Actin, Elongation Factor 1 and 2 (EF1 and EF2) in European abalone <i>Haliotis tuberculata</i> .	104
Figure 29: Real time q-PCR analysis of eight candidate genes in sexually mature or immature abalone foot-muscle, gills and hemocytes following handling or air exposure.	106
Figure 30: Discriminant analysis of the gene expression dataset, classed by abalone groups.	107
Figure 31: Cumulative mortalities of sexually mature and immature European abalone following exposure to stress (handling, air exposure) and challenge with <i>Vibrio harveyi</i> .	108
Figure 32: Influence of time of contact with <i>Vibrio harveyi</i> on mortality kinetic in the European abalone.	129
Figure 33: Microscopic observations taken on European abalone organs and fluorescent bacteria, immediately after the contact with GFP-tagged <i>Vibrio harveyi</i> strain ORM4.	130
Figure 34: <i>Vibrio harveyi</i> density in European abalone organs during contact.	131
Figure 35: <i>Vibrio harveyi</i> detection by quantitative PCR in European abalone tissue and hemolymph.	132
Figure 36: Dynamic infection of <i>Vibrio harveyi</i> in tissues of the European abalone.	133
Figure 37 : Cinétique de mortalités d'ormeaux européens soumis à des injections à doses croissantes de suspensions bactériennes de la souche ORM4 ou de la souche LMG 7890 de <i>Vibrio harveyi</i> .	140
Figure 38 : « Lethal times » (LT50) estimés lors d'injection de la souche ORM4 à 16 et 19°C ou de la souche LMG 7890 à 19°C de <i>Vibrio harveyi</i> chez des ormeaux européens.	139
Figure 39 : Protéines impliquées dans la virulence de la souche ORM4 de <i>Vibrio harveyi</i> .	143

Figure 40 : Cycle infectieux de <i>Vibrio harveyi</i> chez l'ormeau européen (en vue ventrale).	146
Figure 41 : Opéron Toxine/Antitoxine.	150
Figure 42 : Schéma du mécanisme de virulence des espèces <i>Yersinia</i> basé sur la synthèse de la sécrétion des effecteurs Yop.	153
Figure 43 : Schéma hypothétique des premières étapes de l'infection induites par <i>Vibrio harveyi</i> chez l'ormeau européen et facteurs de virulence potentiels associés.	154
Figure 44: Fluctuations of hemocytes parameters in <i>Haliotis tuberculata</i> following <i>Vibrio harveyi</i> exposure at 3h, 9h and 24h post-contact –T3, T9, T24.	166
Figure 45: Expression profiles of Glutamine synthase (GLS), Ferritin, Clathrin, Rel/NFκB, Mpeg and MNK genes in <i>Haliotis tuberculata</i> hemocytes, following <i>Vibrio harveyi</i> exposure at 3h, 9h and 24h post-contact –T3, T9, T24.	168
Figure 46: Enzymatic activities of Glutamine synthase (GLS), Cytochrome c oxidase (CCO), Acid phosphatase (AP), Phenoloxidase (PO) and Superoxide dismutase (SOD) in <i>Haliotis tuberculata</i> hemocytes, following <i>Vibrio harveyi</i> exposure at 3h, 9h and 24h post-contact –T3, T9, T24.	170
Figure 47: Correlation between global response of <i>Haliotis tuberculata</i> hemocytes and <i>Vibrio harveyi</i> concentration in hemolymph.	171
Figure 48 : Expressions de gènes d'intérêt liés au métabolisme branchial, lors des stades précoces de l'interaction entre <i>Vibrio harveyi</i> et l'ormeau européen.	180
Figure 49 : Activités enzymatiques de la glutamine synthétase (GLS), de la Cytochrome C oxydase (CCO), de la Glutathion-S-transférase (GST) et de Superoxyde dismutase (SOD) au niveau des branchies d'ormeaux, lors des stades précoces de l'interaction avec <i>Vibrio harveyi</i> .	182
Figure 50 : Concentration en malondialdehyde (MDA) au niveau des branchies d'ormeaux, lors des stades précoces de l'interaction avec <i>Vibrio harveyi</i> .	184
Figure 51 : Expressions de gènes d'intérêt liés à la réponse immunitaire, lors des stades précoces de l'interaction entre <i>Vibrio harveyi</i> et l'ormeau européen.	188
Figure 52 : Caractéristiques cellulaires des hémocytes d'ormeaux, lors des stades précoces de l'interaction avec <i>Vibrio harveyi</i> .	190
Figure 53 : Schéma récapitulatif des conditions de développement de la vibriose et les disparités phénotypiques observées entre les ormeaux sensibles et résistants.	202
Figure 54 : Schéma récapitulatif de la mise en place de l'interaction entre <i>Vibrio harveyi</i> et l'ormeau européen et des principales stratégies de virulence du vibriion pathogène.	205
Figure 55 : Tests d'activités d'extraits algaux sur la croissance de <i>Vibrio harveyi</i> , réalisés à la température et au temps d'incubation optimal de la souche.	207

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définitions des termes et expressions « agent pathogène », « pathogénicité », « virulence » et « facteur de virulence ».	27
Tableau 2 : Différenciation phénotypique des espèces <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> et <i>V. parahaemolyticus</i> .	31
Tableau 3 : Maladies infectieuses recensées chez les ormeaux.	59-60
Tableau 4 : Variations globales des paramètres immunitaires mesurés dans les études de Cheng et collaborateurs (2004)	71
Tableau 5 : Primer sequences used in real time qPCR analysis.	113
Tableau 6 : Variability of real time q-PCR data (Cp value) for four putative reference genes in European abalone <i>H. tuberculata</i> . Values in bold correspond to the mean with the smallest standard deviation (sd) and * indicate the best reference gene according to the NormFinder application.	114
Tableau 7 : Results of the Wilcoxon comparisons showing significant differences in the changes of immune parameters between (i) sexually mature abalone acclimated at 19°C and at 16°C (MAT 19°C and MAT 16°C) and (ii) sexually mature and immature abalone acclimated at 19°C (IMAT 19°C and MAT 19°C).	115
Tableau 8 : Percentages of cumulated mortalities in European abalone after 12 days of infection and lethal time during which 50% of abalone stock were dead (LT50), reported for each contact time with <i>V. harveyi</i> .	137
Tableau 9 : Statistical significance of <i>V. harveyi</i> during multiple infection times: concentrations or densities in European abalone organs.	138
Tableaux 10A et B : Rôle des gènes identifiés au sein du génome de la souche ORM4 de <i>V. harveyi</i> , pathogène de l'ormeau européen, et compartimentation cellulaire de ces gènes.	141
Tableau 11 : Exemples de séquences codantes et protéines potentielles associées, présentes au sein du génome de la souche ORM4 de <i>V. harveyi</i> .	144
Tableau 12: Primer sequences used in real time qPCR analysis.	175
Tableau 13: Effects of pathogen exposure and time on data of gene expression analysis, immune parameters and enzymatic activity measures, estimated by Wilcoxon tests. The values in bold are statistically significant at the level of 0,05.	176
Tableau 14 : Réponse des hémocytes d'ormeaux européens après 3h, 9h et 24h d'exposition à <i>V. harveyi</i> , en balnéation à 19°C, par rapport à des ormeaux non exposés prélevés en même temps.	191
Tableau 15 : Réponse transcriptomique des ormeaux européens et mortalités observées après une exposition à <i>Vibrio harveyi</i> , selon les conditions imposées (stress induit) et leurs caractères de résistance à la vibriose.	203

Liste des abréviations

AAI	pourcentage d'identité des acides aminés de marqueurs peptidiques
AMP	peptides antimicrobiens ou "Antimicrobial Peptides "
AP	"Acid phosphatase"
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adenosine-5'-Triphosphate
CCO	Cytochrome C Oxydase
cDNA	brin d'ADN complémentaire
CFU	"Colony-Forming Unit"
COX	"Cytochrome c oxidase "
DA	analyse discriminante ou "Discrimant Analysis"
DDH	pourcentage de similarité génomique
DH	Densité Hémocytaire
ECP	protéines extracellulaires
EF1	"Elongation Factor 1"
EF2	"Elongation Factor 2"
<i>et al.</i>	et collaborateurs
GC	pourcentage de variation du nombre de bases nucléotidiques Guanine et Cytosine
GFP	"Green-Fluorescent Protein"
GLS	Glutamine Synthase
GST	Glutathion Transférase
<i>H.</i>	<i>Haliotis</i>
<i>H. t.</i>	<i>Haliotis tuberculata</i>
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène ou "hydrogen peroxide "
hsp	"heat-shock protein"
LEMAR	Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin
LITAF	"Lipopolysaccharide-induced TNF- α factor"
LPS	lipopolysaccharides
LT50	"lethal time"
MAPK	"Mitogen-Activated Protein Kinases"
MDA	Malondialdehyde
MEP	Macrophage-Expressed Protein
mg	milligramme
mL	millilitre
MLSA	pourcentage de similarité entre des séquences de marqueurs génomiques
MNK	gene Menkes
Mpeg	Macrophage-expressed protein
NaCl	chlorure de sodium
O ₂	molécule de dioxygène
p	probabilité
PAMP	"Pathogen-Associated Molecular Patterns"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PI	inhibiteur de protéase ou "Inhibitor Protease"
PO	Phénoloxydase

PRP	"Pattern Recognition Protein"
Rel/NF- κ B	"Nuclear Factor Kappa-ight-chain-enhancer of activated B cells"
ROS	molécules réactives de l'oxygène ou "Reactive-Species Oxygen"
RT	"Real-Time"
RT-qPCR	PCR en temps réel ou "Real Time quantitative PCR"
SOD	Superoxyde Dismutase
<i>sp.</i>	<i>species</i>
SSH	banques soustractives ou "Suppression Subtractive Hybridization"
TA	Toxine-Antitoxine
TLR	"Toll-like receptors"
TNF	"Tumor Necrosis Factor"
TPx	"Thioredoxin Peroxidase "
TRAF	"TNF-receptor-associated factors"
TTSS	système de sécrétion de type III
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
VH	Viabilité Hémocytaire

Contexte général

Un organisme vivant n'est pas isolé dans son environnement et interagit en permanence avec son milieu et les autres organismes qui l'occupent. Les interactions biologiques peuvent se réaliser entre organismes de la même espèce – interaction intraspécifique – ou entre organismes d'espèces différentes – interaction interspécifique. Parmi les interactions interspécifiques, se distinguent les cas de prédation, de compétitions (pour l'espace, la nourriture, etc...) et de symbioses. Le terme « symbiose » regroupe les relations étroites et persistantes entre organismes, dont le degré varie en fonction du bénéfice que retirent ou non les différents partenaires de cette interaction (De Bary, 1879; Paracer et Ahmadjian, 2000) (Fig. 1) :

- en cas de mutualisme, l'interaction bénéficie aux deux partenaires ;
- en cas d'amensalisme ou de commensalisme, l'interaction est respectivement préjudiciable ou bénéfique pour l'un des partenaires, et neutre pour l'autre ;
- en cas de parasitisme, l'interaction est préjudiciable pour l'un des partenaires, l'hôte, et bénéfique pour l'autre, le parasite.
-

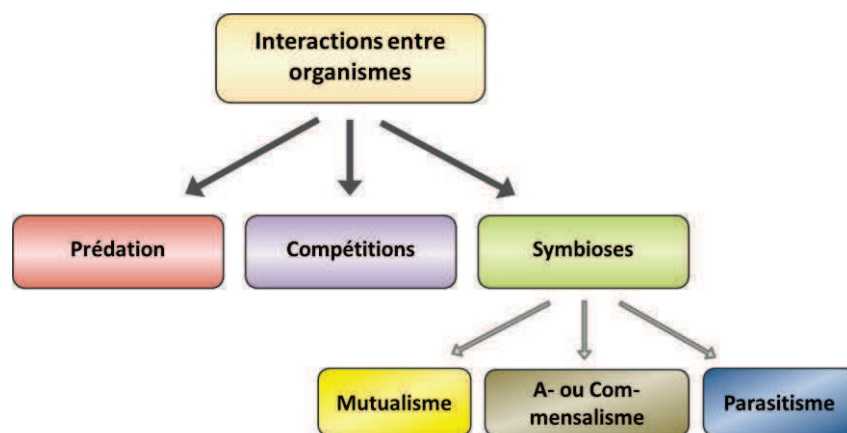


Figure 1 : Schéma conceptuel des différentes interactions entre organismes.

L'apparition des parasites daterait des prémices de la vie sur Terre. Actuellement, certaines études estiment que plus de la moitié des espèces sont des espèces parasites (De Meeûs et Renaud, 2002). La ferveur pour ce mode de vie tient au fait qu'un organisme-hôte offre à son parasite une source de nourriture, un habitat et parfois un moyen de dispersion.

La classification des parasites peut s'effectuer selon différents critères. Selon le critère biologique, les micro-parasites ou agents pathogènes tels que les virus, bactéries, mycètes et protistes, se différencient des macro-parasites constitués de métazoaires. Selon leur critère infectieux, un parasite est dit ectoparasite s'il vit ou crée des dommages à la surface de son hôte, ou endoparasite s'il vit et crée des dommages à l'intérieur de l'organisme-hôte. Tout organisme vivant peut être un hôte potentiel, seule la taille de cet organisme étant un facteur limitant à la charge parasitaire¹ ou au nombre d'espèces parasites en interaction.

L'influence des parasites sur les traits de vie de leurs hôtes, tels que la croissance, la reproduction, ou la survie leur confère une importance majeure dans la régulation des communautés vivantes et l'évolution du vivant. Les interactions hôte-parasites constituent des systèmes co-évolutifs à l'intérieur desquels l'enjeu pour le parasite est de posséder des adaptations nécessaires pour rencontrer son hôte et survivre lorsque la rencontre s'est produite (cf. notion de compatibilité²), et l'intérêt de l'hôte est de prévenir la rencontre ou de lutter contre la prolifération du parasite (Fig. 2). Des pressions sélectives s'exercent donc constamment entre l'espèce-hôte et l'espèce-parasite, la capacité de défense des hôtes faisant écho à l'évolution des stratégies de virulence et d'échappement des parasites, et inversement. Ces mécanismes continuels de pression sélective entre l'espèce-hôte et l'espèce-parasite présentent les caractères d'une course aux armements décrite dans la théorie de la Reine Rouge proposée par Leigh Van Valen (van Valen, 1973).

Notons ici que tout organisme est capable de reconnaître les molécules et particules appartenant au non-soi³, et de développer contre elles une machinerie de mécanismes de défense. Chez les organismes les plus « évolués », ces mécanismes sont élaborés, impliquent de multiples cellules et diverses molécules circulantes, et s'inscrivent dans la fonction immunitaire. Le parasite doit alors pouvoir contourner, éviter, moduler, voire manipuler ces systèmes de défense afin de survivre dans le système-hôte.

¹ Nombre de parasites de la même espèce exploitant un hôte.

² Seconde phase d'une interaction hôte-parasite qui survient après la phase de rencontre et qui correspond à l'établissement d'une relation durable entre les deux partenaires, lorsque l'hôte n'élimine pas directement son parasite.

³ Tout élément reconnu comme n'appartenant pas à l'organisme.

L'étude des capacités immunitaires est donc une étape fondamentale pour la compréhension des interactions hôte-parasite.

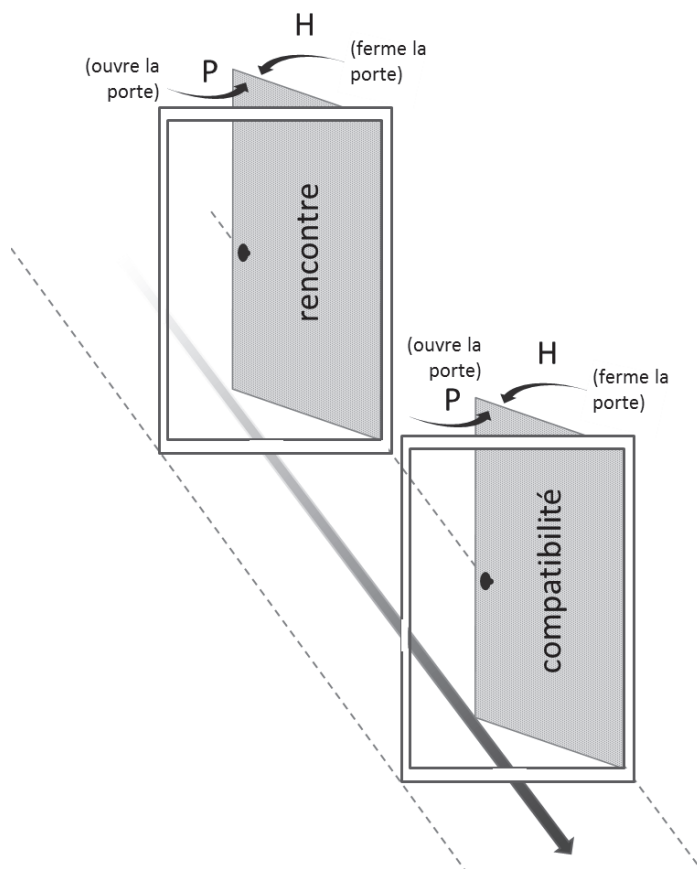


Figure 2: Schéma des processus de rencontre et de compatibilité dans les systèmes hôte-parasites (Combes, 2010).

La sélection dans le génome des parasites tend à ouvrir le passage, tandis que la sélection dans le génome des hôtes tend à la fermer. Les portes symbolisent des phénotypes croisés soumis aux pressions opposées du parasite (P) et de l'hôte (H).

Les interactions hôte-parasite ne peuvent s'accomplir qu'à un temps donné et, dans un espace considéré relatif à l'hôte ou à leur environnement (Combes, 2010). Ces interactions sont donc également conditionnées par l'environnement dans lequel les deux partenaires se côtoient, et les conditions environnementales peuvent avoir une importance majeure dans la rencontre ou l'établissement de la relation. La prise en compte de ces conditions environnementales est donc nécessaire afin d'appréhender le fonctionnement d'une interaction hôte-parasite. Une telle approche intégrative des interactions hôte-parasite-environnement peut être illustrée par le schéma conceptuel proposé par Snieszko, initialement imaginé pour expliquer l'effet des conditions environnementales sur le développement des maladies de poissons (Snieszko, 1973) (Fig. 3).

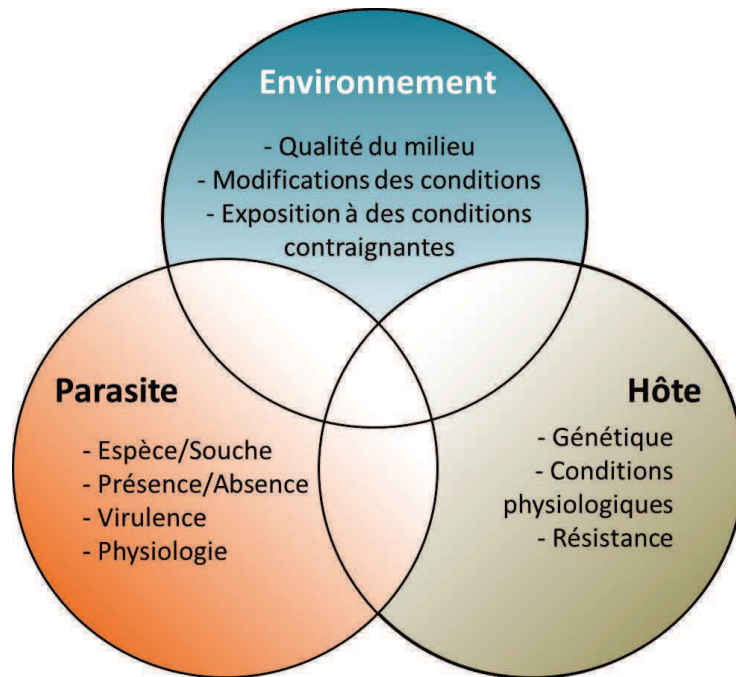


Figure 3 : Schéma conceptuel des interactions hôte-parasite-environnement (adapté de Snieszko, 1973).

L'évolution de la vie humaine n'est pas sans répercussion sur l'intensification des interactions hôte-parasites (Daszak *et al.*, 2000; Combes, 2010). Ainsi, la conquête de nouveaux écosystèmes, la diversification des modes de vie, l'essor des moyens de transports, le changement climatique global, etc... ont permis la rencontre et l'établissement de relation entre des parasites potentiels et leur nouvel hôte. Harvell et collaborateurs ont notamment exposé, dans un article publié dans la revue Science, l'influence du réchauffement climatique sur l'émergence et la sévérité des maladies infectieuses⁴ chez les organismes terrestres et marins (Harvell *et al.*, 2002). Plusieurs études ont, en effet, démontré la corrélation entre des épidémies affectant des espèces du milieu marin (coraux, poissons, bivalves, etc...) et le réchauffement global, et révèlent les problèmes engendrés quant à la rentabilité des activités aquacoles, la conservation des espèces et la santé humaine (Rosenberg et Ben-Haim, 2002; Ghittino *et al.*, 2003; Poulin et Mouritsen, 2006; Emch *et al.*, 2008).

⁴ Altération des fonctions d'un organisme vivant, due à l'infestation par un organisme-parasite.

Les espèces d'ormeaux ne sont pas épargnées par ce phénomène, deux exemples majeurs en témoignent : 1/ La fréquence accrue, ces 20 dernières années, des épisodes El Niño⁵, attribuée au changement climatique global, semble accélérer le développement de la maladie dénommée « Withering Syndrome⁶ » responsable de mortalités massives chez les espèces d'ormeaux américains (Moore *et al.*, 2002; Raimondi *et al.*, 2002; Vilchis *et al.*, 2005). Cette maladie a fortement contribué au déclin des populations de l'espèce *Haliotis cracherodii* actuellement considérée comme une espèce en voie d'extinction, par l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN) (Altstatt *et al.*, 1996). 2/ L'autre exemple se réfère à l'émergence d'une vibriose⁷ chez l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* (Nicolas *et al.*, 2002; Travers *et al.*, 2009a) sur le littoral normand et breton (France) alors que la température des eaux côtières de ces régions a augmenté de 1°C, les 15 dernières années (Esnault et Barraer, 2005). Cette maladie, attribuée à l'espèce *Vibrio harveyi*, provoque des mortalités massives, observées durant la période estivale en structures aquacoles et ne se déclenche qu'au-dessus de 17°C (Travers *et al.*, 2008b) (Fig. 4).

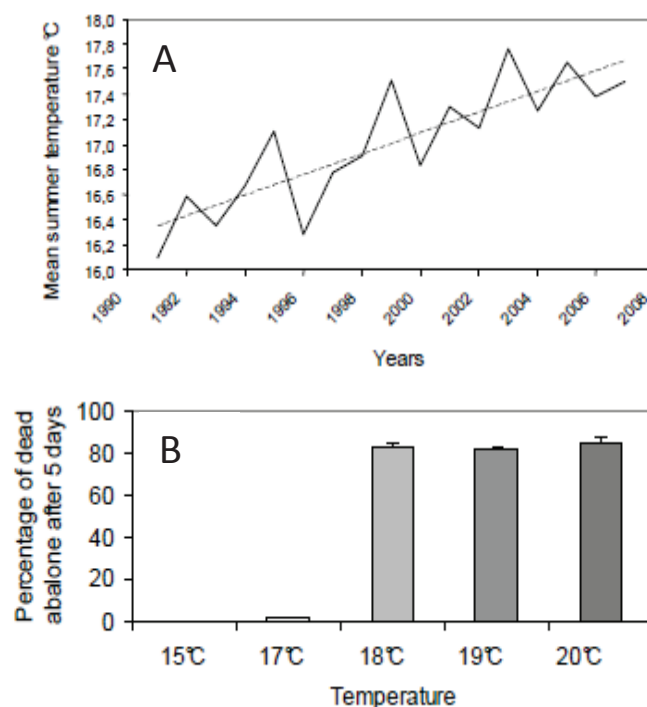


Figure 4 : Emergence et déclenchement de la vibriose de l'ormeau européen en fonction de la température (Travers *et al.*, 2009a).

A : Températures moyennes sur une station du littoral normand où les mortalités d'ormeaux ont été observées à partir de 1998 ; B : Température influençant les mortalités d'ormeaux au laboratoire après exposition à une eau contenant 10^5 vibrions/mL pendant 24h.

L'état des connaissances sur les espèces *Vibrio* du clade *Harveyi* ; sur la biologie, les maladies infectieuses et l'immunité des ormeaux ; et sur cette interaction entre l'ormeau européen et *V. harveyi* sera exposé dans la partie « Rappels bibliographiques ».

⁵ Phénomène d'inversion des courants de l'Océan pacifique tropical

⁶ Maladie infectieuse due à la bactérie de type rickettsie *Candidatus Xenohaliotis californiensis*

⁷ Maladie infectieuse due aux bactéries du genre *Vibrio*

Rappels bibliographiques

I. Les bactéries appartenant au clade *Harveyi*

A-Taxonomie, espèces et biologie

L'origine du terme « *Vibrio* » date de la description de la première espèce du genre, *V. cholerae*, par un médecin italien **Filippo Pacini**, en 1854, qui identifie alors son mouvement vibratoire particulier. Il associe cette bactérie aux épidémies de **choléra** qui surviennent en Europe pendant la fin du XIX^{ème} siècle. Cette observation sera ensuite validée par les travaux de **Robert Koch** débutés en 1883 en Inde, pendant lesquels il remarque inlassablement la présence d'un bacille singulier dans les nécroses intestinales de patients atteints du choléra.

Les vibrions ont d'abord été décrits selon leurs caractéristiques phénotypiques : morphologie, incurvation et présence d'éléments mobiles. Des analyses biochimiques (source de carbone, tolérance au sel, activité enzymatique, etc...) menées dès la seconde moitié du XIX^{ème} siècle ont permis de décrire de nombreuses nouvelles espèces et de spécifier leur appartenance au genre *Vibrio* (Davis et Park, 1962). L'avènement des techniques moléculaires telles que l'hybridation génique puis le séquençage de marqueurs génomique a permis d'améliorer les connaissances précédemment acquises sur la taxonomie des « Vibrios ». Ainsi, les analyses phylogénétiques récentes basées sur des données phénotypiques et sur le séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S, *recA*, *pyrH* et *ropA* ont démontré l'existence de 4 familles au sein des espèces *Vibrio* : les *Salinivibrionaceae*, les *Enterovibrionaceae*, les *Photobacteriaceae* et les **Vibrionaceae** (Fig. 5) (Thompson *et al.*, 2005). D'après le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les *Vibrionaceae* comprennent uniquement le genre *Vibrio*, et sont des bactéries en forme de bacilles et gram négatif, généralement mobiles par la présence d'au moins un flagelle, mésophiles et chimio-organotrophes à métabolisme fermentatif facultatif (Brenner *et al.*, 2005). Le genre *Vibrio* regroupe des espèces de **bactéries aquatiques** principalement isolées en milieu estuarien ou en eaux côtières. Ces vibrions peuvent être libres dans la colonne d'eau, présents à la surface sédimentaire, ou en **association symbiotique avec des organismes marins** notamment avec des copépodes (Kaneko et Colwell, 1973; Huq *et al.*, 1983; Thompson *et al.*, 2006).

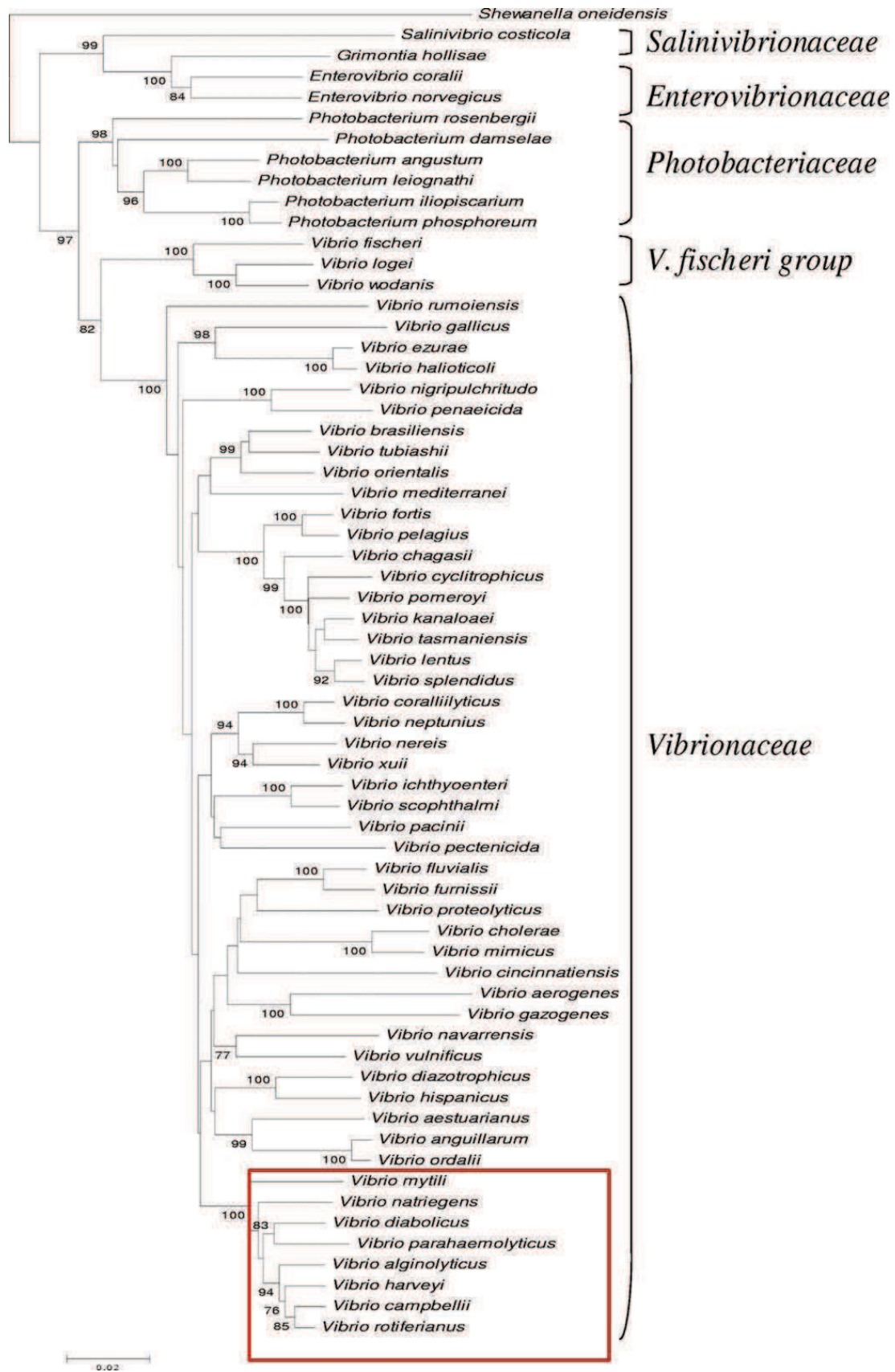


Figure 5 : Arbre phylogénétique des espèces *Vibrio* recensées après séquençage des gènes 16S ARNr, *rpoA*, *pyrH*, et *recA*. (Thompson *et al.*, 2005).

Les espèces appartenant au clade *Harveyi* sont encadrées en rouge.

Des études d'hybridation génomique menées par Baumann et collaborateurs (1980) supplémentées des analyses phylogénétiques de séquences concaténées de 9 gènes entreprises par Sawabe et collaborateurs ont permis de différencier 14 clades au sein des « Vibrios » dont le **clade Harveyi** (Baumann *et al.*, 1980; Sawabe *et al.*, 2007b)(Fig. 6). Les critères de différenciation phylogénétiques utilisés correspondent au pourcentage de similarité génomique (DDH) révélé par des tests d'hybridation, au pourcentage de variation du nombre de bases nucléotidiques Guanine et Cytosine (GC), au pourcentage de similarité des séquences des 9 marqueurs génomiques cités précédemment (MLSA) et au pourcentage d'identité des acides aminés de marqueurs peptidiques (AAI). Le clade *Harveyi* regroupe initialement les espèces suivantes : *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. natriegens*, *V. mytili*, et *V. azureus*. Au sein de ce clade, le DDH varie entre 29 et 69%, le GC entre 42 et 48%, le MLSA entre 90.1 et 96.2 et le AAI entre 97.2 et 99.4. Récemment, trois espèces supplémentaires ont été intégrées au clade *Harveyi* : *V. communis*, *V. owensii*, et *V. jasicida* (Cano-Gomez *et al.*, 2010; Chimento *et al.*, 2011; Yoshizawa *et al.*, 2012).

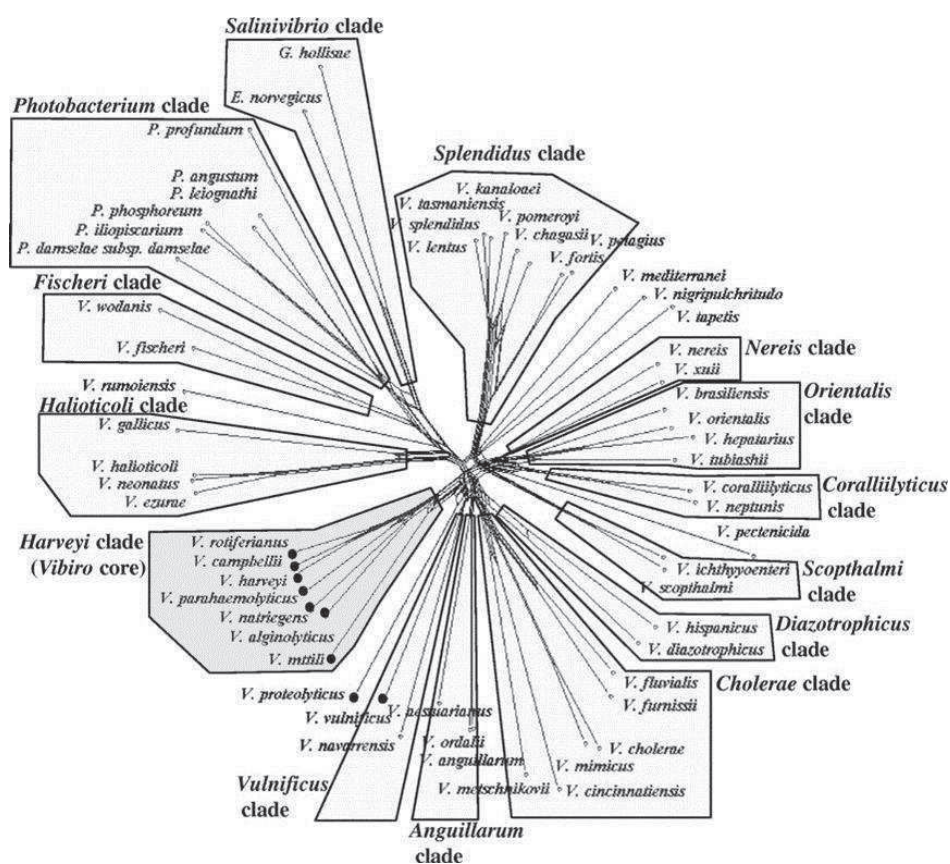


Figure 6 : Arbre phylogénétique basé sur le séquençage de neuf gènes (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *topA*, et 16S ARNr) chez les « Vibrios » (Sawabe *et al.*, 2007b).

B- Pathogénicité, virulence et maladies induites

1. Notions et définitions

L'intervention de microorganismes dans l'apparition de maladies a d'abord été envisagée par un anatomiste allemand de l'université de Göttingen, Friedrich Jakob Henle en 1840. Inspiré des travaux de Henle, Robert Koch accomplit dans cette même université les prémices de la recherche en patho-microbiologie. Il met notamment en évidence la causalité bactérienne dans le développement des maladies de l'anthrax et de la tuberculose. En 1890, Koch énonce les standards ou postulats à satisfaire pour qu'un microorganisme puisse être considéré comme l'agent responsable d'une pathologie (Fig. 7).

Les **postulats de Koch**, bien que servant de ligne conductrice aux recherches en pathologie et en microbiologie, ont été régulièrement remis en question, du fait par exemple de l'existence d'individus porteurs sains dans certaines maladies, de pathologies virales chez lesquelles l'agent infectieux ne peut être cultivé, ou de symptomatologie variée pour un même agent infectieux (pour revue Evans, 1976).

Postulats de Koch

- Le microorganisme doit être présent en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais absent des organismes sains ;
- le microorganisme doit pouvoir être isolé de l'organisme malade et cultivé *in vitro* ;
- le microorganisme cultivé doit entraîner la maladie lorsqu'il est introduit dans un organisme sain ;
- le microorganisme doit être à nouveau isolé du nouvel organisme rendu malade et identifié comme identique à l'agent infectieux original.

Postulats de Falkow

- Le constituant bactérien ou gène doit être retrouvé uniquement chez les espèces pathogènes d'un genre donné ou chez les souches virulentes d'une espèce ;
- l'inactivation spécifique (mutation) de ce gène doit réduire la virulence bactérienne ;
- la réintroduction dans la souche mutée du gène sauvage doit restaurer la pleine virulence.

Postulats de Casadevall et Pirofski

- La pathogenèse microbienne est la résultante d'une interaction entre un hôte et un microorganisme et ne peut être attribuée uniquement à l'un ou l'autre ;
- le développement d'une pathologie au cours de cette interaction est déterminée par l'importance des dommages causés à l'hôte ;
- ces dommages peuvent résulter de facteurs microbiens et/ou de la réponse de l'hôte.

Figure 7 : Postulats de la pathogenèse énoncés par Robert Koch en 1890, puis ceux publiés par Casadevall et Pirofski en 2003 et les postulats moléculaires de Falkow en 1988.

Depuis le début du XX^{ème} siècle, les notions de pathogénicité et de virulence n'ont cessé d'évoluer. Les premières définitions, considéraient principalement les propriétés intrinsèques des agents pathogènes, minimisant la physiologie de l'hôte dans le développement d'une pathologie. Des approches intégratives de l'interaction hôte-pathogène ont ensuite été évoquées afin de pallier aux manquements des postulats de Koch et de ses successeurs. Casadevall et Pirofski ont notamment proposé un modèle conceptuel « **the damage-response framework** » dans lequel ils émettent trois nouveaux postulats de la pathogénèse microbienne (Fig. 7 et 8) et redéfinissent les termes et expressions « agent pathogène », « pathogénicité », « virulence » et « facteur de virulence » (Tableau 1) (Casadevall et Pirofski, 1999, 2003, 2009).

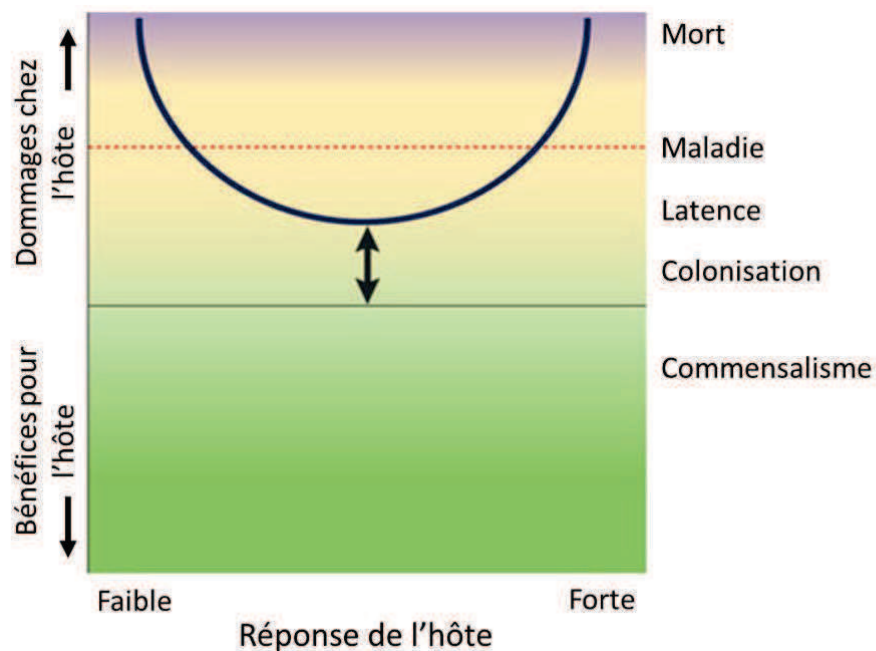


Figure 8 : Modèle conceptuel de la pathogénèse proposé par Casadevall et Pirofski en 2003.

Le diagramme montre la variabilité de l'intensité des dommages générés chez un hôte suite à une infestation parasitaire, en fonction de l'amplitude de la réponse de cet hôte. Dans ce modèle, l'interaction hôte-parasite peut ne pas conduire à l'apparition de dommages, ou à la persistance du parasite en phase de latence ou de maladie. Les dommages à l'hôte sont plus sévères aux extrémités du diagramme, i.e. lorsqu'il émet face à la présence du parasite une réponse faible et insuffisante ou lorsqu'il émet une réponse exagéré et inappropriée.

Les couleurs verte, jaune et violette symbolisent respectivement les stades de bonne santé, de maladie et de maladie sévère voire de mort.

Tableau 1 : Définitions des termes et expressions « agent pathogène », « pathogénicité », « virulence » et « facteur de virulence » proposées communément dans le domaine de la Microbiologie ou en Ecologie (Casadevall et Pirofski, 1999).

Définitions	En microbiologie	D'après Casadevall et Pirofski
Agent pathogène	Microorganisme parasitaire capable de causer une maladie infectieuse	Microorganisme capable de causer des dommages chez un hôte
Pathogénicité	Capacité d'un microorganisme à induire une maladie infectieuse	Capacité d'un microorganisme à causer des dommages chez un hôte
Virulence	Degré de pathogénicité	Relative capacité d'un microorganisme à causer des dommages chez un hôte
Facteur de virulence	Constituant d'un agent pathogène indispensable à la virulence mais pas à la survie Constituant d'un agent pathogène qui aide à l'induction d'une maladie infectieuse	Constituant d'un agent pathogène qui induit des dommages chez un hôte, peut inclure des éléments essentiels à la survie

Plusieurs définitions du terme « virulence » sont proposées selon le domaine scientifique concerné. En pathologie, la virulence est l'effet d'un agent pathogène en lien avec le processus infectieux. Dans le domaine de l'écologie, ce terme est défini comme une augmentation de la mortalité de l'hôte induite par un parasite ou comme une réduction de la fitness⁸ de l'hôte causée par un parasite. La définition utilisée en microbiologie, indiquée dans le tableau 2, suggère que la virulence est associée à un ou plusieurs gènes. Afin de déterminer si un gène ou constituant bactérien est un déterminant de la virulence, Falkow a adapté les postulats de Koch et créé les postulats moléculaires en 1988 (Falkow, 1988, 2004) (Fig. 7).

⁸ Capacité d'un organisme à produire des descendants capables de se reproduire, en comparaison avec les autres individus de la même population, et/ou à transmettre à la génération suivante ces gènes (Fisher, 1930; Hamilton, 1964).

2. Les espèces pathogènes du clade *Harveyi*

Au regard de la définition du terme « pathogénicité » exposée précédemment, certains agents pathogènes de crustacés, mollusques, poissons ou encore de l'Homme appartiennent au clade *Harveyi*. Des cas de vibrioses observées chez des organismes aquatiques en milieu naturel ou en structures aquacoles ont, en effet, été induites par les espèces *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *V. rotiferianus*. Des mortalités massives observées chez des espèces d'ormeaux ont été attribuées aux 3 premières espèces citées et seront ultérieurement évoquées dans ce manuscrit.

Il est important de souligner que la virulence dépend de la souche bactérienne mise en cause, de l'espèce hôte ciblée et des conditions environnementales.

a. *Vibrio harveyi*

Décrite pour la première fois, en 1936, par Johnson et Shunk et dénommée alors *Achromobacter harveyi* (Johnson et Shunk, 1936), l'espèce a ensuite été assignée au genre *Lucibacterium* (Hendrie *et al.*, 1970), *Beneckeia* (Reichelt et Baumann, 1973) et finalement incluse au sein du genre *Vibrio* suite à l'analyse de la séquence complète du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (Dorsch *et al.*, 1992). Après étude de leurs caractéristiques phénotypiques et génomiques, les espèces préalablement désignées ***V. carchariae*** et ***V. trachuri*** sont actuellement considérées comme des synonymes de l'espèce *V. harveyi* (Pedersen *et al.*, 1998; Gauger et Gomez-Chiarri, 2002; Thompson *et al.*, 2002).

L'espèce *V. harveyi* est pathogène pour de nombreux organismes marins invertébrés et vertébrés issus de populations sauvages ou d'élevage (pour revue Austin et Zhang, 2006). Des cas de vibrioses imputables à *V. harveyi* ont été observés à l'**échelle mondiale** et induisent des **symptômes variés**. De nombreuses espèces de poissons d'élevage développent, par exemple, des gastro-entérites ou des nécroses entérites suite au contact avec *V. harveyi*, telles que le mérrou *Epinephelus coioides*, la dorade *Sparus aurata*, le flet *Paralichthys dentatus*, et le tambour rouge *Sciaenops ocellatus*. Des lésions tissulaires ont également été observées, de type épidermique chez le homard *Panulirus homarus*, le barramundi *Lates calcarifer* et le concombre de mer *Holothuria scabra*, de type cornéenne

chez le brochet *Centropomus undecimalis* et le poisson-lait *Chanos chanos*, et de type hémorragique chez la dorade *Sparus aurata* et l'hippocampe *Hippocampus sp.* Des cas de vasculites⁹ ont également été rapportés notamment chez deux espèces de requins *Carcharhinus plumbeus* et *Negaprion brevirostris*.

V. harveyi est également un agent pathogène majeur d'espèces de crevettes et est associé au syndrome de **vibriose luminescente**. Des observations microscopiques montrent une colonisation du tractus digestif chez les larves *via* la cavité orale (Lavillapitogo *et al.*, 1990). Cette vibriose induit des troubles de l'alimentation, des perturbations du développement, une altération de la capacité motrice et une dégénération du tissu hépato-pancréatique (Karunasagar *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1998). A terme, les crevettes souffrent de septicémie¹⁰ à l'origine de mortalités massives (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996). La vibriose luminescente est considérée comme une menace majeure pour la production de crevettes en Asie et Amérique du Sud (Austin et Zhang, 2006) (Fig. 9).

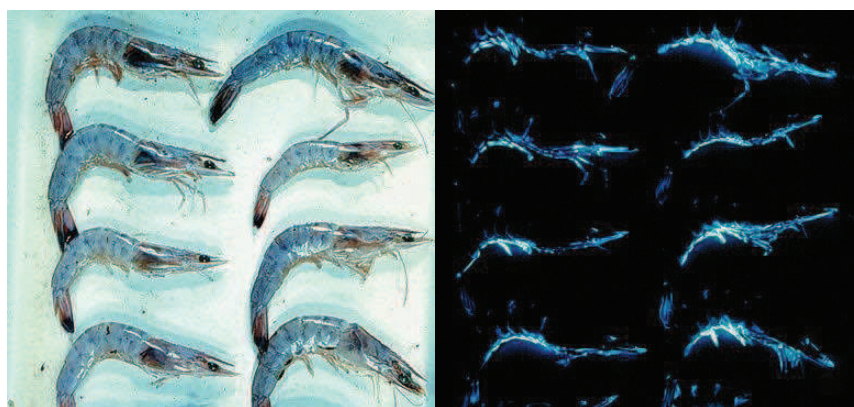


Figure 9 : Photographies de crevettes *Penaeus monodon* atteintes de vibriose luminescente.

A : sous lumière normale, B : à l'obscurité. La luminosité visible sur la photographie B est attribuée à l'invasion par des bactéries *Vibrio harveyi* bioluminescentes.

La confusion phénotypique et moléculaire entre les espèces *V. harveyi* et *V. campbellii* (cf. partie C) ne me permet pas d'évoquer les cas de vibrioses attribuées à cette dernière espèce avec exactitude.

⁹ Inflammation du système circulatoire

¹⁰ Infection générale grave de l'organisme par des agents pathogènes.

b. Les autres espèces pathogènes du clade Harveyi

Vibrio alginolyticus

V. alginolyticus est une espèce commune des eaux côtières marines mondiales. Reconnue agent **pathogène de l'Homme** en 1973 par Zen-Yoji et collaborateurs (Zen-Yoji *et al.*, 1973), l'espèce a également été isolée chez de nombreux **organismes marins** tels que des poissons, crustacés, mollusques, ou mammifères marins (pour revue Thompson *et al.*, 2006). Les conséquences de l'infection sont diverses et peuvent résider en l'apparition de blessures épidermiques, de nécroses, d'infection des yeux, ou induire un état de léthargie ou une septicémie. Des cas de mortalité massive chez le bar européen *Dicentrarchus labrax*, la dorade royale *Sparus aurata* et chez la palourde *Ruditapes decussatus* ont été attribués à cette espèce (pour revue Ruwandeeepika *et al.*, 2012). Il est actuellement admis que *V. alginolyticus* est l'une des menaces pathogènes les plus importantes en aquaculture, notamment dans les **élevages asiatiques de crevettes** (Lee *et al.*, 1996; Selvin et Lipton, 2003).

Vibrio parahaemolyticus

Espèce isolée pour la première fois au Japon, *V. parahaemolyticus* est reconnu, à travers le monde, comme la cause majeure de **gastro-entérites chez l'Homme** après le choléra, suite à la consommation de produits marins (Thompson *et al.*, 2006; Broberg *et al.*, 2011). Actuellement, 12 souches pathogènes de *V. parahaemolyticus* ont été identifiées chez l'Homme (Gonzalez-Escalona *et al.*, 2011). Des cas de septicémies ont également été rapportés suite à une infection causée par *V. parahaemolyticus* chez des sujets immunodéprimés (pour revue Broberg *et al.*, 2011). La prévalence de l'espèce dans l'eau ou dans les organismes marins est positivement corrélée à la température de l'eau. Il est, en effet, admis que la densité de *V. parahaemolyticus* est négligeable en dessous de 14°C (Kaneko et Colwell, 1973).

Outre sa pathogénicité avérée envers l'Homme, plusieurs cas de vibrioses chez deux espèces de **crevettes** *Penaeus monodon* et *Litopenaeus vannamei* ont été attribués à *V. parahaemolyticus* (Ruangpan et Kitao, 1991; Vandenberghe *et al.*, 1999).

Vibrio rotiferianus

Isolée pour la première fois dans des eaux d'élevage de rotifères *Brachionus plicatilis* en Belgique, puis chez différentes espèces de coraux et chez le vivaneau *Lutjanus guttatus* (Gomez-Gil *et al.*, 2003; Gomez-Gil *et al.*, 2007), la pathogénicité de *Vibrio rotiferianus* n'est avérée que chez la **truite** *Oncorhynchus mykiss* (Austin *et al.*, 2005).

C- Identification et détection des espèces pathogènes du clade *Harveyi*

L'identification et la détection des agents pathogènes sont primordiales dans les études épidémiologiques. Parmi le clade *Harveyi*, trois espèces ont fait l'objet d'analyses d'identification et de détection plus avancées : *V. alginolyticus* et *V. parahaemolyticus* du fait de leur pathogénicité avérée envers l'Homme, et *V. harveyi* du fait des pertes économiques majeures occasionnées par les épidémies imputées à l'espèce dans les structures aquacoles mondiales. Les approches traditionnelles basées sur des analyses phénotypiques et les approches moléculaires seront abordées dans cette partie.

1. Les approches phénotypiques et biochimiques

Les caractéristiques phénotypiques et biochimiques des espèces citées ci-dessus sont rapportées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Différenciation phénotypique des espèces *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* et *V. parahaemolyticus* d'après Brenner *et al.*, 2005. + : positif entre 90 et 100% ; (+) : positif entre 75 et 89,9% ; a : positif entre 25 et 74,9% ; - : positif entre 0 et 10%.

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Croissance sur milieu :			
8% NaCl	+	-	(+)
10% NaCl	a	-	-
Fermentation du :			
Sucrose	+	+	-
L-arabinose	-	-	(+)
Taille de la zone d'inhibition autour de colistine	large	petite	large

La caractérisation phénotypique des espèces au sein du clade *Harveyi*, initiée dans les années 1990 (Kuhlmann, 1989; Alsina et Blanch, 1994a, 1994b; Harris *et al.*, 1996), a été ensuite remise en cause du fait de son manque de résolution, de la possible confusion entre espèces voire de l'impossibilité d'identification (Vandenberghe *et al.*, 1999; Hisbi *et al.*, 2000). Il est notamment admis que la similarité des caractères phénotypiques et génétiques entre les espèces *V. harveyi* et *V. campbellii* rend difficile leur distinction par ce type de méthode (Thompson *et al.*, 2006). Bien qu'initialement, Alsina et Blanch évoquaient une discrimination possible entre ces deux espèces par l'incapacité de *V. campbellii* à dégrader l'ornithine (Alsina et Blanch, 1994a), des études récentes soulèvent la nécessité des approches moléculaires pour les différencier de manière fiable (Gauger et Gomez-Chiarri, 2002; Gomez-Gil *et al.*, 2004). La confusion d'identification entre *V. harveyi* et *V. campbellii* pourrait être à l'origine d'une sous-estimation de la pathogénicité de *V. campbellii* (Cano-Gomez *et al.*, 2009).

2. Les approches moléculaires

L'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis le développement de méthodes précises d'identification et de génotypage des espèces du clade *Harveyi* (pour revue Cano-Gomez *et al.*, 2009; Bisha *et al.*, 2012). Ces méthodes sont basées sur l'**analyse soit du génome** soit de **marqueurs génomiques spécifiques**.

a. Les méthodes basées sur l'analyse du génome

L'analyse du génome à des fins d'identification et de détection des bactéries fait référence à deux types de techniques :

1/ l'**hybridation ADN-ADN** qui vise à évaluer les similarités de la séquence du génome entre deux souches bactériennes. Chez les espèces *Vibrio*, la limite de distinction entre deux souches a été fixée par Thompson et collaborateurs à 80% de similarité génomique (Thompson *et al.*, 2004) au lieu de la limite canonique de 70% généralement employée chez les espèces bactériennes (Wayne, 1988).

2/ les méthodes de génotypage telles que l'**analyse de polymorphisme de longueur** de fragments d'ADN amplifiés dans leur intégralité (AFLP) ou digérés par des enzymes de restriction (RFLP) , ou de séquences extra-géniques répétées (REP-PCR) ou de séquences aléatoirement amplifiées (RAPD) (Cano-Gomez *et al.*, 2009; Marhual et Das, 2009; Bisha *et al.*, 2012; Marhual *et al.*, 2012). Ces techniques d'identification et de détection sont onéreuses, et requièrent une analyse précise et coûteuse en temps. De plus, la plasticité génomique, i.e. la capacité des bactéries à acquérir de nouveaux gènes et ainsi à modifier leur génome, peut affecter la reproductibilité de ces techniques et biaiser l'interprétation du jeu de données.

b. L'analyse de marqueurs génomiques

Plusieurs marqueurs génomiques ont été précédemment utilisés afin d'identifier les espèces du clade *Harveyi* (Liu *et al.*, 2004; Levin, 2006; Luo et Hu, 2008; Cano-Gomez *et al.*, 2009). L'analyse de ces marqueurs consiste en leur amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces spécifiques de l'espèce et en la révélation de l'amplification par électrophorèse. Conejero et Hedreyda ont notamment établi des séquences d'amorces du **gène ToxR** afin de détecter l'espèce *V. harveyi* (Conejero et Hedreyda, 2003).

L'analyse génomique par **PCR en temps réel** (« real-time PCR ») a permis d'optimiser la détection des espèces *Vibrio* et de développer des méthodes de **quantification** de vibrions pathogènes, en eau de mer et/ou dans les tissus d'organismes marins (Campbell et Wright, 2003; Takahashi *et al.*, 2005a; Blackstone *et al.*, 2007; Saulnier *et al.*, 2009). Bien que génératrice de gain de temps dans la préparation des échantillons et l'analyse des résultats, peu d'études utilisent cette technique dans la détection et la quantification d'espèces du clade *Harveyi* (Blackstone *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2005b; Zhou *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011). Dans la littérature, une seule étude s'y réfère pour la détection de *V. harveyi* (Fukui et Sawabe, 2008). Afin de développer une méthode sensible et fiable de quantification de *V. harveyi*, Schikorski et collaborateurs ont donc mis au point une technique de real-time PCR adaptée aux échantillons liquides (Schikorski *et al.*, sous presse).

Le manque de résolution des analyses de marqueurs uni-gènes, lors de la discrimination des espèces du clade *Harveyi*, a incité le développement de **méthodes multi-locus** (MLSA)

(Thompson *et al.*, 2005; Sawabe *et al.*, 2007b; Thompson *et al.*, 2007). Cette technique permet de comparer simultanément les séquences de plusieurs marqueurs génomiques. Les études mentionnées ci-dessus et basées sur cette technique ont notamment permis de distinguer le clade *Harveyi* au sein des Vibrionaceae, de spécifier les espèces *Vibrio* incluses dans ce clade et de valider la distinction entre les espèces *V. harveyi*, *V. campbellii* et *V. rotiferianus*. L'étude de Lin et collaborateurs, basée également sur cette technique, a permis de conclure que les deux souches de référence de *V. harveyi* dont le génome entièrement séquencé était disponible dans les bases de données génomiques, ATCC BAA-1116 et HY-01, appartiennent finalement à l'espèce *V. campbellii* (Lin *et al.*, 2010).

D'autres approches, basées principalement sur la reconnaissance par des anticorps spécifiques, peuvent permettre la détection d'espèces du clade *Harveyi* (Phianphak *et al.*, 2005; Sithigorngul *et al.*, 2006; Manti *et al.*, 2010)

D-Facteurs de virulence du clade *Harveyi*

Selon l'ouvrage de Mims et collaborateurs (Mims *et al.*, 2002), plusieurs étapes sont nécessaires dans l'émergence d'une pathologie et la réussite d'une infection par un microorganisme : 1/ une **phase de reconnaissance, d'adhésion** puis de **pénétration** dans l'organisme hôte, 2/ une phase de **multiplication et d'invasion** dans les tissu-hôtes généralement reliée aux mécanismes d'évasion du système immunitaire-hôte, 3/ une phase de genèse de **dommages** chez l'hôte et 4/ une phase de sortie de l'organisme-hôte et de **transmission** de l'agent pathogène à un individu sain.

A chacune de ces étapes, interviennent des **facteurs de virulence**, parmi lesquels certains d'entre eux peuvent intervenir lors de plusieurs phases du cycle infectieux.

1. Les facteurs d'adhésion

a. Facteur d'adhésion et de mobilité

La capacité d'une bactérie à adhérer à la surface externe d'un hôte potentiel conditionne la réussite de l'infection et est donc considérée à part entière comme un facteur de virulence (Beachey, 1981). Ce stade initial de l'infection bactérienne est régi par l'interaction entre des protéines périphériques de la bactérie et des protéines situées à la surface des tissu-hôtes. Généralement, les études rapportent plusieurs modalités d'adhésion chez les espèces *Vibrio* pathogènes marines : *via* l'attachement à la **surface muqueuse** de l'hôte, *via* sa **surface chitineuse** ou *via* les **sécrétions coquillères** de bivalves (pour revue Paillard, 2004; Thompson *et al.*, 2006). Dans tous ces cas, l'intervention d'éléments morphologiques de la **mobilité** des « Vibrios », comme les flagelles et les pili, joue un rôle primordial dans leur orientation vers l'organisme-hôte.

La majorité des « Vibrios » décrits sont capables de mobilité grâce à la présence d'un flagelle polaire. Il a été également démontré que les espèces du clade *Harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. harveyi* possèdent deux systèmes de flagelles adaptés aux différentes conditions de viscosité du milieu (Shinoda *et al.*, 1992; McCarter, 2004). Le **flagelle polaire** aide à la mobilité dans les environnements liquides et assure la nage bactérienne ou « swimming », tandis que les **flagelles latéraux**, souvent multiples, permettent le déplacement dans des milieux visqueux et sur des surfaces solides et assurent ainsi le « swarming » (Fig. 10A, B et C). Le fonctionnement de ces deux types de flagelles, ie. leur rotation, dépend de l'énergie électrochimique générée par les flux transmembranaires d'ions sodium (Na^+) dans le cas du flagelle polaire ou de protons dans le cas des flagelles latéraux (Fig. 10A) (Atsumi *et al.*, 1992; Kawagishi *et al.*, 1995).

Le mouvement des vibrions est dirigé par la transduction de signaux environnementaux chimiques attractifs ou répulsifs. Ce mécanisme, appelé **chimiotactisme**, contrôle la rotation des filaments flagellaires dans des structures de type polaire ou latérale et donc l'orientation des bactéries (Sar *et al.*, 1990; Homma *et al.*, 1996).

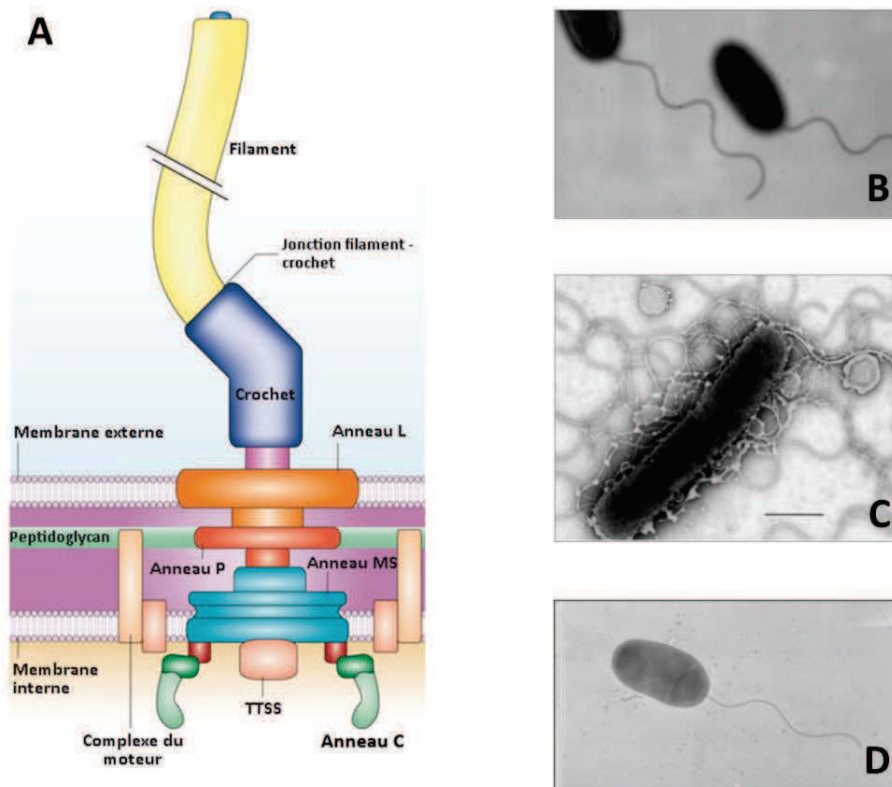


Figure 10 : Schéma simplifié de la structure d'un flagelle chez les bactéries gram négatif et photographies de flagelles chez des espèces *Vibrio* du clade *Harveyi*.

A : Structure du flagelle des bactéries gram négatif (adapté de Pallen et Matzke, 2006). Le flagelle bactérien est un complexe protéique composé d'un filament formé d'un empilement de monomères d'une seule protéine, la flagelline, et dirigé vers le milieu extérieur, en aval d'un crochet qui maintient le filament flagellaire au corps basal. Le corps basal est constitué de structures protéiques en anneaux qui s'insèrent dans les membranes bactériennes : deux anneaux internes MS et C, ancrés dans la membrane interne, qui servent de « rotor » et initient les changements de direction du flagelle, et deux anneaux externes P et L, ancrés dans la membrane externe, qui servent de « stator » et maintiennent l'ensemble du complexe protéique. La rotation du flagelle est assurée par la conversion de l'énergie électrochimique générée par des pompes proton- ou sodium-dépendantes au niveau du complexe du moteur en énergie mécanique.

B : Photographie au microscope électronique à transmission d'une bactérie *Vibrio parahaemolyticus* et de son flagelle polaire (McCarter, 2001). Les proportions de la cellule sont de $1 \times 2 \mu\text{m}$.

C : Photographie au microscope électronique à transmission d'une bactérie *V. parahaemolyticus* et de ses flagelles latéraux (McCarter, 2001). Le diamètre des flagelles latéraux sont d'environ 15nm.

D : Photographie au microscope électronique à transmission d'une bactérie *V. harveyi* et son flagelle polaire (Travers, 2008). Les proportions de la cellule sont de $1 \times 2 \mu\text{m}$.

Les bactéries peuvent produire d'autres structures filamenteuses, plus simples et plus courtes que les flagelles, dénommées **pili** ou *fimbriae* qui jouent un rôle fondamental dans l'adhésion aux cellule-hôtes (Kline *et al.*, 2009). Ces *pili* sont formés d'une succession d'une seule sous-unité protéique, la piline. Actuellement, de nombreuses études se sont focalisées sur la structure et le fonctionnement du *pilus* de **type IV** du fait de son importance dans les processus d'adhésion, d'échappement immunitaire, de formation de colonies, de transformation bactérienne et de transduction des phages (pour revue Craig *et al.*, 2004; Shime-Hattori *et al.*, 2006). La présence de *pili* en surface de la cellule bactérienne et leur implication dans l'adhésion aux cellule-hôtes ont été mises en évidence chez *V. parahaemolyticus* (Honda *et al.*, 1988; Nakasone et Iwanaga, 1990, 1991).

Des molécules d'**adhésines** présentes à la surface des bactéries agissent comme des vecteurs d'attachement sur les surfaces muqueuses. Une étude récente a décrit la présence d'une adhésine de type MAM (« Multivalent Adhesion Molecule ») chez *V. parahaemolyticus* et mis en évidence son implication dans l'attachement aux molécules membranaires d'une cellule-hôte potentielle (Krachler *et al.*, 2011).

La chitine est un biopolymère glucidique et un constituant majeur des cuticules et exosquelettes de mollusques et crustacés. La dégradation de la chitine à des fins nutritionnelles ou infectieuses requiert les mêmes étapes : 1/ reconnaissance et attachement à la chitine, et 2/ synthèse des enzymes et protéines impliquées dans le catabolisme glucidique et 3/ hydrolyse puis captation des produits de dégradation (Keyhani et Roseman, 1999). La première étape est assurée par des protéines de reconnaissance et des peptides de fixation dénommés « **chitin-binding peptide** ». Montgomery et Kirchman (1993) ont démontré l'implication de deux peptides dans l'attachement aux molécules de chitine chez *V. harveyi*. Le premier peptide initie l'attachement tandis que l'autre, dont la synthèse dépend du temps d'attachement, est considéré comme un « chitin-binding peptide ». L'étape d'hydrolyse de la chitine en oligosaccharides potentiellement utilisables par la bactérie est permise par l'activité d'enzymes spécifiques : les **chitinases**. Svitil et collaborateurs ont identifié 6 gènes codant pour des chitinases différentes chez *V. harveyi*, suggérant l'efficacité de l'utilisation de différentes formes de chitines du milieu marin chez cette espèce (Svitil *et al.*, 1997).

b. Polysaccharides extracellulaires, capsule et biofilm

La production de polysaccharides extracellulaires par des bactéries intervient dans la virulence *via* la formation de capsules denses et de biofilms. La synthèse de polysaccharides complexes a été observée chez *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. harveyi* (Ruwandeeepika *et al.*, 2012).

La **capsule** des « Vibrios », i.e. la couche organisée imperméable autour de la cellule, est impliquée dans l'attachement aux cellules hôtes et la capacité d'échappement des processus immunitaires de l'hôte. Chez *V. parahaemolyticus*, des bactéries encapsulées montrent des capacités d'adhésion aux cellules épithéliales supérieures à celles non encapsulées (Hsieh *et al.*, 2003).

Les polysaccharides extracellulaires participent également à la composition des **biofilms** bactériens, lesquels permettent l'adhésion sur des surfaces biotiques ou abiotiques, la croissance et le développement de populations bactériennes. La majorité des bactéries existe en milieu naturel sous la forme de biofilms. Ce mécanisme de regroupement bactérien dans une matrice extracellulaire peut s'expliquer par le fait que les bactéries en présence résistent plus efficacement aux **conditions contraignantes**, telles que la présence de molécules antimicrobiennes, la déshydratation, les radiations UV, etc... (Mah et O'Toole, 2001; Donlan et Costerton, 2002). Les études menées par Faruque et collaborateurs tendent à démontrer que chez les espèces *Vibrio*, les biofilms ont une importance majeure dans la **survie** et la **virulence** (Faruque *et al.*, 2006). La formation de biofilms chez *V. harveyi* conférerait à l'espèce une **résistance aux antibiotiques** utilisés dans les éclosiers de crevettes et favoriserait ainsi sa survie et le développement de la vibriose (Karunasagar *et al.*, 1994).

2. Facteurs d'invasion, de multiplication et inducteurs de dommages

a. Exotoxines et exo-enzymes

Toutes les espèces pathogènes du clade *Harveyi*, produisent des **protéines extracellulaires** (ECP) de type hémolysines, lipases ou phospholipases, protéases, etc... (pour revue Ruwandeepika *et al.*, 2012). Ces exo-enzymes lytiques et exotoxines, excrétées en dehors de la cellule bactérienne, jouent un rôle majeur dans la **nutrition bactérienne** et dans la **virulence** de ces espèces, i.e. dans leur capacité à envahir et induire des dommages dans les tissu-hôtes. Les études menées sur les exotoxines et exo-enzymes produites par des espèces du clade *Harveyi* se sont principalement concentrées sur l'action des hémolysines et des protéases (Ruwandeepika *et al.*, 2012).

Les **hémolysines** sont des exotoxines sécrétés par des bactéries et dont le mode d'action induit la **lyse des cellule-hôtes**, dont les cellules immunitaires, par la formation de pores membranaires. Les hémolysines constituent des ECP importantes au sein des espèces pathogènes *Vibrio* et des espèces du clade *Harveyi* (Shinoda, 1999). L'espèce *V. parahaemolyticus* possède une hémolysine thermostable qui agit comme une porine à la surface des cellules sanguines et induit un déséquilibre osmotique qui précède la lyse cellulaire (Raimondi *et al.*, 2000). Zhang et collaborateurs ont révélé l'existence de deux gènes codant pour des hémolysines chez une souche particulièrement virulente de *V. harveyi* envers les salmonidés (Zhang *et al.*, 2001a). Plusieurs études tendent à démontrer la relation entre la synthèse d'hémolysine et la pathogénicité chez *V. harveyi* (Sun *et al.*, 2007; Ruwandeepika *et al.*, 2011b).

Des **protéases**, i.e. des enzymes capables de **dégrader des protéine-hôtes** telles que la gélatine, le collagène ou la fibronectine, ont été identifiées chez *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* (Ruwandeepika *et al.*, 2012). La toxicité de différentes protéases produites par *V. alginolyticus* a été démontrée chez des larves de l'huître d'*Ostrea edulis*, chez la crevette *Penaeus japonicus*, et chez *Epinephelus coioides* (Nottage et Birkbeck, 1987; Chen *et al.*, 1999; Rui *et al.*, 2009). Une étude menée par Sudheesh et Zu a également révélé l'activité létale de fractions de protéases extracellulaires extraites chez *V. parahaemolyticus*, purifiées par chromatographie, et injectées aux crevettes *Penaeus*

monodon (Sudheesh et Xu, 2001). Ruwandeepika et collaborateurs ont récemment mis en évidence une augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéases chez des « Vibrios » appartenant au clade *Harveyi* lors d'une infection de larves de crevettes *Artemia franciscana* (Ruwandeepika *et al.*, 2011a).

b. Système de sécrétion de type III

Les systèmes de sécrétion de type III (TTSS) sont des **complexes protéiques**, synthétisés par les bactéries Gram négatif, qui servent à la **translocation de facteurs de virulence** directement dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Chez *V. parahaemolyticus*, deux TTSS et leur implication majeure dans la pathogénicité de souches virulentes ont été mis en évidence (Makino *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004). Des groupes de gènes associés à la constitution du TTSS ont également été détectés chez *V. harveyi* et *V. alginolyticus* (Henke et Bassler, 2004; Zhao *et al.*, 2010).

c. Sidérophores

Les sidérophores sont des **protéines** de faible poids moléculaire sécrétées par des microorganismes, et chélatrices de l'ion ferrique, élément nécessaire à leur maintien et à leur croissance. Au cours du processus infectieux, la biodisponibilité en fer peut être réduite, ce qui active la synthèse de sidérophores, tel que cela a été vérifié chez plusieurs espèces de *Vibrio* (Kustusch *et al.*, 2011), et plus particulièrement chez *V. parahaemolyticus* (Yamamoto *et al.*, 1994) et chez *V. alginolyticus* (Wang *et al.*, 2007). Chez *V. harveyi*, l'activité des sidérophores semble être reliée à la virulence dans le cas d'infections de saumons atlantiques. En revanche, elle est négligeable chez des souches isolées à partir d'invertébrés marins, ce qui suggère la faible implication des sidérophores dans la pathogénicité de *V. harveyi* envers les vertébrés (Owens *et al.*, 1996).

3. Facteurs d'échappement des cellules immunitaires

a. Capsule

Certaines espèces du genre *Vibrio* sont capables de sécréter une capsule de polysaccharides à la surface de la cellule afin d'échapper au mécanisme de défense de l'hôte. Chez *V. vulnificus*, l'encapsulation semble être corrélée avec la virulence et la résistance aux activités bactéricides du sérum (pour revue Strom et Paranjpye, 2000). Chez l'espèce *V. parahaemolyticus*, des souches déficientes en matériel capsulaire sont plus sensibles à l'activité des hémocytes d'huîtres (Volety *et al.*, 2001).

b. Inhibition de la capacité d'adhésion

Cette stratégie d'échappement vise à **altérer la morphologie** de cellules immunitaires, empêchant ainsi leur fonction d'adhésion. Ce processus a été révélé chez plusieurs souches pathogènes du genre *Vibrio*, notamment chez *V. tapetis* dans le cas d'infection de palourdes *Ruditapes philippinarum* (Choquet *et al.*, 2003; Allam et Ford, 2006), et de *V. aestuarianus* dans le cas d'infection d'huîtres *Crassostrea gigas* (Labreuche *et al.*, 2006). Chez les espèces du clade *Harveyi*, un seul cas a été rapporté, après observation d'hémocytes de moules *Mytilus edulis* infectées par *V. alginolyticus* (Nottage et Birkbeck, 1990; Lane et Birkbeck, 1999).

c. Activité anti-oxydante

La capacité des bactéries pathogènes à **résister au déséquilibre oxydatif**, généré soit par stratégie de virulence soit par les cellules immunitaires en cas d'infection, est primordiale pour leur survie et fait intervenir la production d'enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) (Lynch et Kuramitsu, 2000). Des gènes codant pour une SOD et l'activité de cette enzyme ont notamment été mis en évidence chez des espèces du clade *Harveyi* et pourraient donc contribuer à leur pouvoir pathogène (Shyu *et al.*, 1999; Vattanaviboon *et al.*, 2003; Munn *et al.*, 2008).

4. Modulation et régulation de la virulence

a. L'effet densité ou « Quorum sensing »

Le « Quorum sensing » est un mécanisme de **communication intercellulaire** qui intervient dans la régulation de l'expression génique en réponse à la présence ou absence de signaux chimiques. Ce mécanisme a d'abord été décrit en tant que processus de contrôle de la bioluminescence chez *V. fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). Depuis la fin des années 1990, il est admis que ce mécanisme permettait la **coordination d'activités cellulaires complexes** à l'échelle de populations bactériennes, telles que la formation de biofilms. Les études récentes montrent la complexité de ce mécanisme de communication intercellulaire au cours duquel différents types de signaux chimiques peuvent être reconnus, intégrés ou émis, et ce, afin d'apprécier notamment la densité cellulaire ou la présence de plusieurs espèces de bactéries.

Chez *V. harveyi*, le mécanisme de « Quorum sensing » et de reconnaissance de signaux chimiques spécifiques aboutit à la synthèse ou non d'un facteur de transcription génique¹¹ LuxR (Defoirdt *et al.*, 2008) (Fig. 11). En l'absence de molécules inductrices du signal (HAI-1, AI-2 et CAI-1), une cascade de phosphorylation initiée par les récepteurs de ces molécules inductrices (LuxN, LuxQ et CqsS) entraîne successivement la phosphorylation de deux protéines effectrices LuxU et LuxO. La phosphorylation de cette dernière induit la synthèse de petits ARN non codants, anti-sens aux ARN messagers¹² de LuxR, qui inhibent donc sa traduction en protéine. L'activation de gènes affins pour LuxR n'a donc pas lieu. A l'inverse, en présence de molécules inductrices du signal, la protéine LuxO est déphosphorylée et donc inactive. Les petits ARN non codants ne sont pas produits et le facteur de transcription LuxR est synthétisé. LuxR pourra ainsi se fixer sur des promoteurs de gènes affins et induire la synthèse de protéines impliquées potentiellement dans la virulence de *V. harveyi* telles que le système de sécrétion de type III, une toxine extracellulaire, une metalloprotéase et un sidérophore (Fig. 12).

¹¹ Protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la première étape de la synthèse protéique, à savoir la transcription, et donc à la synthèse d'ARN messagers.

¹² Copie transitoire d'une séquence d'ADN issue de la transcription d'un ou plusieurs gènes, qui sera ensuite utilisée dans le processus de synthèse protéique.

Le mécanisme de « *Quorum sensing* » chez les autres espèces du clade *Harveyi*, telles que *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* semble être très similaire à celui décrit chez *V. harveyi* (Ruwandeeepika *et al.*, 2012).

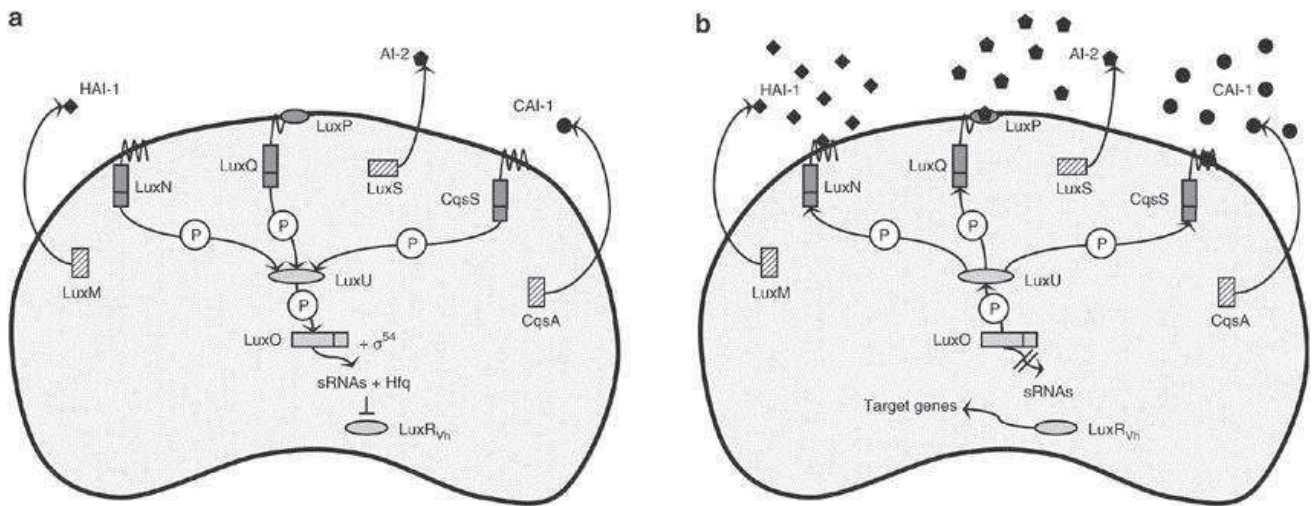


Figure 11 : « *Quorum sensing* » chez *Vibrio harveyi* et cascade d'activation (b) ou d'inhibition (a) du facteur transcriptionnel LuxR (Defoirdt *et al.*, 2008).

Les losanges et les ronds noirs correspondent aux molécules inductrices du signal (HAI-1, AI-2 et CAI-1), spécifiquement reconnus par leur récepteur (LuxN, LuxQ et CqsS) illustrés en rectangles grisés. Les ovales et rectangles gris clair correspondent aux protéines effectrices LuxU et LuxO, phosphorylées en cas de non activation des récepteurs des molécules inductrices, et au facteur de transcription LuxR.

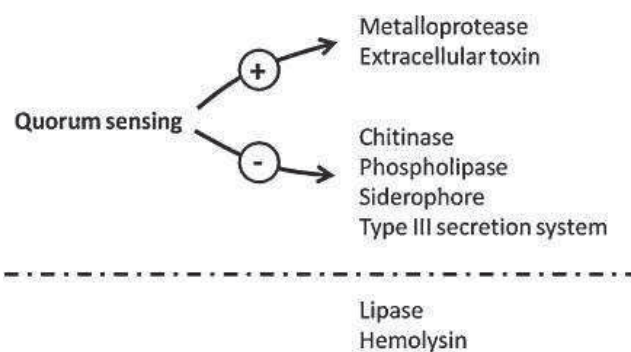


Figure 12 : Synthèse de l'impact du « *Quorum sensing* » sur l'expression de facteur de virulence chez *V. harveyi* (Natrah *et al.*, 2011).

Les facteurs de virulence situés au-dessus de la ligne en pointillés sont régulés par le « *Quorum sensing* », soit positivement (+) soit négativement (-). Les facteurs de virulence situés en dessous de la ligne en pointillés ne dépendent pas du « *Quorum sensing* ».

b. L'effet de facteurs physiologiques de l'hôte

Des études réalisées ces dernières années ont montré l'influence des sécrétions-hôtes sur la modulation de la virulence chez *V. parahaemolyticus*. Les études menées par Nakano et collaborateurs ont notamment permis de mettre en évidence la stimulation de la croissance et de la cytotoxicité chez cette espèce en présence d'hormones de stress de type catécholamine (Nakano *et al.*, 2007a; Nakano *et al.*, 2007b). L'acide biliaire, sécrétion du foie chez les vertébrés mammifères, semble également favoriser sa virulence par induction de la production de protéines du système de sécrétion de type III et des polysaccharides capsulaires, et par augmentation de la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales (Hsieh *et al.*, 2003; Gotoh *et al.*, 2010).

c. L'effet d'autres paramètres

Plusieurs études ont démontré l'influence de paramètres extrinsèques, tels que la température, la salinité et la privation nutritionnelle sur la modulation de la virulence chez des espèces pathogènes du clade *Harveyi* (Alavandi *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2008; Deter *et al.*, 2010; Whitaker *et al.*, 2010; Oberbeckmann *et al.*, 2011).

5. Récapitulatif : cycle infectieux et facteurs de virulence

Les espèces appartenant au clade *Harveyi* disposent de facteurs de virulence variés afin d'assurer le processus infectieux. Ce travail de thèse s'est principalement focalisé sur les deux premières phases de l'infection, à savoir la phase d'adhésion et de pénétration et la phase de multiplication et d'invasion de l'organisme hôte (Fig. 13).

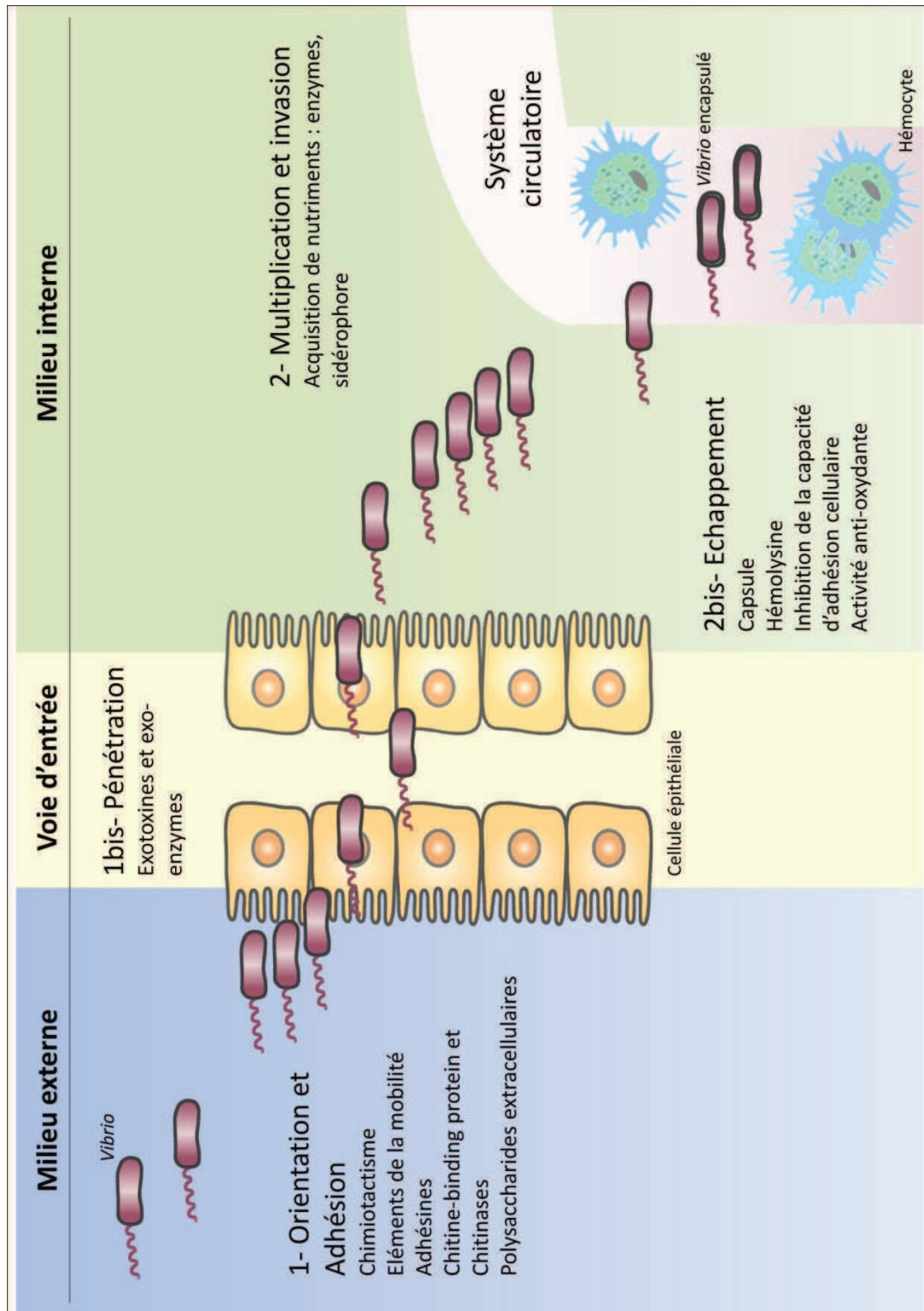


Figure 13 : Les premières étapes hypothétiques de l'infection induites par les bactéries du clade *Harveyi* et facteurs de virulence associés.

Sur ce schéma, seules les deux premières phases du processus infectieux sont illustrées, à savoir l'étape d'adhésion et de pénétration (1 et 1bis) et l'étape de multiplication et d'invasion dans les tissus et dans le système circulatoire (2 et 2bis).

E- Solutions de lutte développées pour l'aquaculture

Tel que cela a été évoqué précédemment, certaines espèces du clade *Harveyi* constituent des menaces majeures pour la pérennité de l'aquaculture à travers le monde. Bondad-Reantaso et collaborateurs ont estimé à 9 G\$ par an le coût des pertes économiques liées aux maladies dans la production mondiale aquacole, soit 15% du chiffre d'affaires total (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). Les pertes dues aux épidémies de vibriose lumineuse, par exemple, se sont élevées à 100 M\$ en 1991 dans les éclosiers indonésiens de crevettes (Defoirdt *et al.*, 2007). Le développement de diverses solutions de lutte¹³ a donc été initié afin d'assurer la rentabilité des structures aquacoles.

1. Administration d'antibiotiques

L'administration d'antibiotiques dans les structures aquacoles a été **largement employée** afin de prévenir et contrôler les épidémies dues aux bactéries *Vibrio*, notamment dans les élevages de crevettes (Moriarty; Holmstrom *et al.*, 2003). Les antibiotiques sont des molécules produites naturellement par des microorganismes afin de bloquer la croissance ou d'induire la mortalité de bactéries compétitrices par exemple en inhibant la synthèse de leur paroi, la réplication de l'ADN, la traduction des protéines ou la production d'énergie. La fréquence importante de l'utilisation d'antibiotiques dans les pays producteurs non réglementés a induit l'apparition de **résistance** chez certaines souches virulentes *Vibrio*, appartenant notamment à l'espèce *V. harveyi* (Karunasagar *et al.*, 1994; Kitiyodom *et al.*, 2010), rendant ainsi leur action inefficace et pouvant être à l'origine d'un problème de santé humaine majeur. D'autres méthodes de lutte contre les vibrions pathogènes ont donc été développées et testées dans les structures aquacoles et sont exposées ci-dessous.

¹³ Terme agricole qui fait référence à l'emploi de moyens et techniques pour combattre des nuisibles qui mettent en péril la rentabilité de l'exploitation.

2. Les pro- et prébiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes ou leurs produits qui, par ingestion, colonisent un organisme cible et lui apportent un bénéfice, initialement en améliorant son équilibre intestinal (FAO/WHO, 2001; Aguirre-Guzman *et al.*, 2012). Pour les espèces marines, les traitements efficaces par probiotiques améliorent la **protection** contre des maladies, en stimulant l'immunité cellulaire et humorale (Rengpipat *et al.*, 2000) ou en agissant comme des compétiteurs des espèces pathogènes ciblées (Vaseeharan et Ramasamy, 2003; Ajitha *et al.*, 2004; Ninawe et Selvin, 2009). L'utilisation de probiotiques en structures aquacoles, dans la perspective de limiter ou d'inhiber la croissance d'espèces pathogènes du clade *Harveyi*, est rapportée dans plusieurs études (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008d; Prado *et al.*, 2010; Silva-Aciaras *et al.*, 2011).

Les prébiotiques sont, selon la définition proposée par Gibson et Roberfroid, des compléments alimentaires qui contribuent à la santé de l'hôte en stimulant la croissance et/ou l'activité de populations bactériennes limitées et compétitrices des espèces pathogènes (Gibson et Roberfroid, 1995). Au sein de l'activité aquacole, cette méthode de lutte contre les agents pathogènes reste peu employée et est principalement réservée à la pisciculture (Merrifield *et al.*, 2010; Ringo *et al.*, 2010).

3. Lutte spécifique : bactériophage et inhibition de la réplication

Les bactériophages sont des entités virales capables d'infecter des bactéries. L'utilisation de bactériophages en tant qu'agent de contrôle des populations bactériennes pour l'aquaculture a déjà été expérimentée dans des élevages de crevettes, afin de lutter contre la vibriose lumineuse. La survie des crevettes a alors atteint entre 17 et 86% du stock en 17 jours, ce qui surpasse l'action des antibiotiques généralement utilisés (Vinod *et al.*, 2006).

Une seconde technique de lutte spécifique vise en l'utilisation **d'inhibiteurs de l'initiation de la réplication du deuxième chromosome** au sein des espèces du genre *Vibrio*. Yamaichi et collaborateurs ont identifié un tel inhibiteur, la vibrépine, et ont montré son efficacité contre la croissance de plusieurs espèces *Vibrio* dont *V. parahaemolyticus* (Yamaichi *et al.*, 2009).

4. Administration d'acides aminés à courtes chaînes

L'administration d'acides aminés à chaînes courtes est couramment utilisée afin d'inhiber la croissance d'agents pathogènes dans les élevages (Van Immerseel *et al.*, 2006; Defoirdt *et al.*, 2009). Une étude de Defoirdt et collaborateurs a notamment démontré l'intérêt de cette technique dans la survie de crevettes souffrant de vibriose attribuée à *V. campbellii* (Defoirdt *et al.*, 2006b).

5. Régulation de la virulence

La régulation de la virulence de bactéries pathogènes peut s'opérer en **perturbant le mécanisme de « Quorum sensing »** par l'utilisation de composants interférant dans la transmission du signal telles que les furanones d'halogènes ou les thiophénones brominées, ou par dégradation des molécules signal par des enzymes de type lactonase (Defoirdt *et al.*, 2011). La première stratégie vise à limiter l'activité de fixation du régulateur de la transcription LuxR à la molécule d'ADN. Cette technique a notamment été testée avec succès afin de prévenir les infections par des espèces du clade *Harveyi* chez les banchiopodes *Artemia franciscana* (Defoirdt *et al.*, 2006a; Defoirdt *et al.*, 2012). Une autre étude, menée par Teasdale et collaborateurs, a montré la capacité de métabolites sécrétés par une bactérie isolée chez l'éponge *Halobacillus salinus* à inhiber le mécanisme de « Quorum sensing » chez *V. harveyi* (Teasdale *et al.*, 2009). Par ailleurs, Nhan et collaborateurs ont mis en évidence la perte de virulence de cultures de *V. harveyi* sur milieu enrichie en lactonases mises en présence de crevettes géantes *Macrobrachium rosenbergii* (Nhan *et al.*, 2010).

II. L'ormeau européen *Haliotis tuberculata*

A-Généralités

Les ormeaux sont des mollusques gastéropodes marins appartenant à la famille **Haliotidae**, décrite par Rafinesque, qui regroupe les espèces du genre *Haliotis* (Rafinesque, 1815). Le nom de ce genre provient étymologiquement des termes de Grec ancien : « *halios* » qui désigne la mer et « *otos* » ou « *otis* » qui signifie l'oreille, et fait donc référence à son habitat et à la forme particulière de sa coquille. Les analyses phylogénétiques et morphologiques effectuées par Geiger, en 1998, ont permis de valider l'existence de **56 espèces** au sein du genre *Haliotis*, dont l'espèce *H. tuberculata* (Geiger, 1998). L'espèce a été décrite pour la première fois par Linné dans son ouvrage *Systema Naturae* (von Linné, 1759), et les premiers spécimens retrouvés à ce jour, lors de fouilles paléontologiques, dateraient du Miocène¹⁴ (Geiger et Groves, 1999).

Trois sous-espèces ont été décrites selon leurs critères morphologiques très similaires : *H. t. tuberculata* (von Linné, 1759), *H. t. lamellosa* (de Lamarck, 1822) et *H. t. coccinea* (Reeve, 1846).

B- Biologie et répartition de l'ormeau européen

1. Anatomie et fonctions biologiques

Les ormeaux présentent une large **coquille unique** qui recouvre les organes et le muscle du pied (Fig. 14). La coquille est légèrement spiralée et est sécrétée par une glande coquillière à l'état larvaire puis par le manteau dès le stade juvénile (Fretter et Pilkington, 1971). Elle est également percée de **pores** qui servent à l'évacuation des déchets de l'alimentation et des gamètes en dehors de la cavité palléale. Sous la coquille, un tissu souple, le **manteau**, protège l'ensemble les organes internes et maintient la masse viscérale attachée à la coquille.

¹⁴ Quatrième époque géologique de l'ère Cénozoïque, qui s'étend de 23 à 5 Ma, approximativement.

Un large **pied musculeux** et ventral assure l'attachement de l'ormeau sur son substrat et sa locomotion. Des **tentacules épipodiaux** tapissent le bord du pied et interviennent dans l'appréciation tactile de l'environnement. La **tête** de l'ormeau est visible dans la région antérieure du muscle pédieux, et se distingue par la présence de deux **tentacules céphaliques extensibles** et une paire d' **yeux** qui assurent respectivement les fonctions sensorielles tactile et visuelle.

La fonction physiologique de la respiration s'effectue par une paire de **branchies** dont la droite est englobée dans une glande riche en mucus, la **glande hypobranchiale** . Chaque branchie est composée de lamelles branchiales qui sont formées d'un épithélium simple à cellules à mucus ou ciliées (Manganaro *et al.*, 2012).

Le tractus digestif débute en position antérieure par une cavité buccale pourvue d'une « langue » à micro-dents, la **radula** , qui sert à râper et broyer les macroalgues ingérées. S'en suit un œsophage, un diverticule gastrique ou glande digestive qui a une fonction sécrétrice d'enzymes de la digestion, et un intestin qui se termine par un anus situé sous les branchies.

Le système circulatoire des ormeaux est dit « semi-ouvert » et composé d'un réseau d'artères, de veines et de lacunes hémolymphatiques qui véhiculent le sang désoxygéné vers le cœur puis les branchies, et le sang oxygéné vers l'ensemble des organes. A l'intérieur de ces capillaires circule l'hémolymphe pourvue de cellules hémocytaires et riche en hémocyanine, pigment fixateur des molécules de dioxygène.

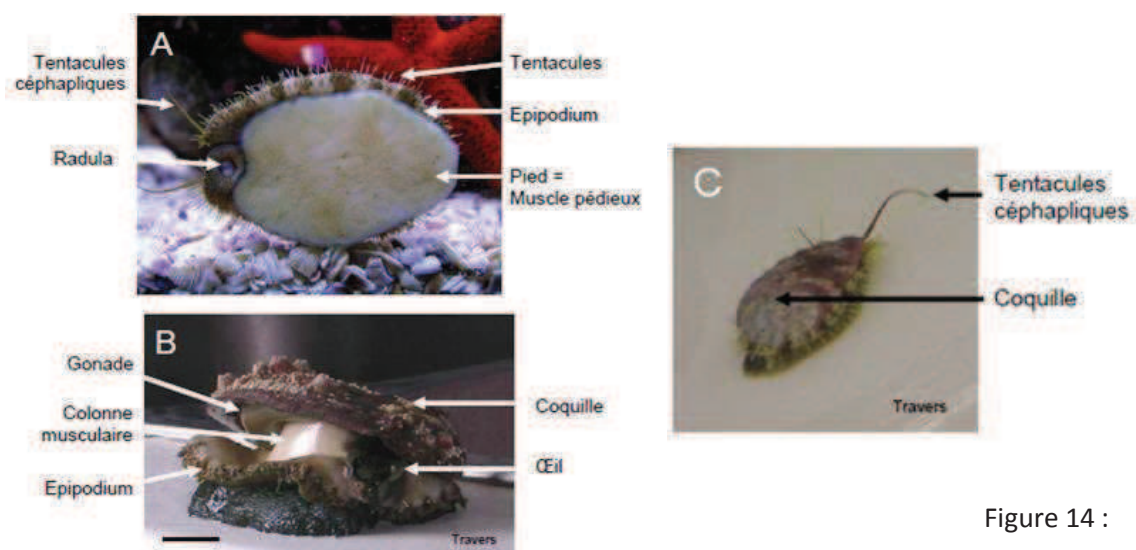


Figure 14 :

Anatomie de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* (Travers, 2008).

A : vue ventrale ; B : Vue faciale ; C : vue dorsale. La barre indique une échelle de 2 cm.

2. Alimentation et croissance

Préférentiellement herbivore, le régime alimentaire de l'espèce *H. tuberculata* est majoritairement composé, à l'âge adulte, de **macroalgues** de type *Enteromorpha*, *Palmaria*, *Laminaria* ou *Ulva* (Koike *et al.*, 1979; Culley et Peck, 1981). L'alimentation des ormeaux de cette espèce dépend principalement de l'apport d'**algues dérivantes** par les courants marins (Clavier et Chardy, 1989). Les jeunes ormeaux, en phase post-larvaire, se nourrissent de diatomées benthiques et d'algues encroûtantes en râpant le substrat à l'aide de leur radula (Crofts, 1929). Trois **transitions alimentaires** majeures ont été rapportées chez les ormeaux : la transition de l'état lécitotrophe¹⁵ vers une alimentation particulaire, le début de l'ingestion effective et de la digestion de microalgues telles que les diatomées, et la transition vers un régime macroalgal (Kawamura *et al.*, 1998).

L'alimentation et la croissance des ormeaux dépend de divers **facteurs biotiques** dont l'âge des animaux, la disponibilité en nourriture, les espèces algales ingérées, la densité populationnelle et la microflore individuelle (Kawamura *et al.*, 2001; Huchette *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2005). Il a notamment été démontré par Basuyaux qu'un régime alimentaire basé sur les espèces *Palmaria palmata* et *Laminaria digitata* favorisait sensiblement la croissance chez *H. tuberculata* (Basuyaux, 1997). Le taux de croissance des ormeaux européens diminue également avec l'augmentation de la densité des stocks (Koike *et al.*, 1979; Mgaya et Mercer, 1995). La croissance de l'espèce est dépendante de la saisonnalité et de la **température**. McBride et collaborateurs ont notamment mis en évidence que l'optimum métabolique des ormeaux européens se situe autour de 18°C (McBride *et al.*, 2001). Par ailleurs, une réduction significative de leur croissance est observée pendant la période hivernale et peut être mise en parallèle avec la faible disponibilité alimentaire et la cessation du processus alimentaire en dessous de la température de 9°C (Peck, 1989).

Initialement, la croissance de l'ormeau était estimée par **mesures des dimensions** de sa coquille, i.e. longueur, largeur et épaisseur. Cependant, plusieurs biais subsistent dans ces mesures, dont la sous-estimation de l'âge des animaux âgés chez lesquels la coquille peut se détériorer plus rapidement que son accroissement (Mottet, 1978). La méthode de mesures

¹⁵ Larve incapable de s'alimenter et qui utilise donc les réserves vitellines pour ses besoins nutritionnels

des intervalles entre les **anneaux de croissance** qui marquent la réduction de la croissance en hiver est donc préférée (pour revue Mgaya, 1995). Son application reste, cependant, difficile faute du manque de prise en compte des arrêts de croissance possibles dus aux facteurs contraignants du milieu ou ceux observés chez des adultes matures en fin de période de ponte. D'autres méthodes ont donc été testées chez les ormeaux, dont celle basée sur **l'analyse isotopique** d'échantillons de coquille (Roussel *et al.*, 2011). Bien que cette dernière semble être performante, elle ne peut être appliquée sur un grand nombre d'échantillons en raison de son coût et de sa demande en temps, matériel et manipulation et reste donc un outil de validation.

3. Habitat, répartition et distribution géographique

Les ormeaux occupent généralement les **estrans et récifs rocheux** de la zone intertidale jusqu'à 100m de profondeur pour certaines espèces (Sloan et Breen, 1988). De fortes densités de populations d'ormeaux européens s'observent dans les zones à **habitat complexe** où ils peuvent s'abriter dans des anfractuosités (Fig. 15B), et à **algues encroûtantes** de type *Lithothamnium spp.* qui procurent aux larves un site de fixation et d'alimentation optimal (Forster, 1962; Clavier et Chardy, 1989).

Certains facteurs environnementaux influencent la distribution de l'espèce *H. tuberculata*, tels que la **température** et la **salinité**. Les populations les plus denses se situent dans des zones côtières dans lesquelles la température est comprise entre 20 et 8°C (pour revue Mgaya, 1995).

La distribution géographique de l'espèce s'étend des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, au nord, aux îles Canaries et au littoral sénégalais, au sud (Gaillard, 1958) (Fig. 15A). Certaines populations éparses d'*H. t. lamellosa* sont également présentes en Méditerranée. Les densités les plus importantes sont observées au niveau des îles anglo-normandes et au nord de la Bretagne.



Figure 15 : Distribution géographique et habitat de l'espèce *Haliotis tuberculata*.

A : distribution géographique (adapté de Gaillard, 1958 et de Travers, 2008), les points rouges représentent les populations sporadiques observées et les traits rouges sont d'autant plus épais que la densité est importante ;

B : photographie d'un ormeau niché dans une anfractuosité rocheuse (Y. Querrec).

4. Reproduction et développement des ormeaux

Les ormeaux sont des organismes **gonochoriques**¹⁶. La **gonade** se situe en position postérieure de l'animal et enveloppe la glande digestive. La reproduction de l'espèce *H. tuberculata* suit un **cycle annuel** : la maturation des gamètes débuterait dès la fin de l'hiver, la période de ponte survient généralement en fin de période estivale, et une résorption de la gonade peut être constatée dès l'automne (Girard, 1972; Hayashi, 1980). L'ampleur de la gonade dans la masse viscérale s'accroît au cours du cycle, et celle-ci devient réellement proéminente avant la ponte. En période de reproduction, le développement manifeste de la gonade permet une distinction des deux sexes, la gonade des individus mâles apparaissant de couleur crème ou vert très clair et celle des femelles de couleur vert foncé à brun-gris (Stephenson, 1924; Crofts, 1929). Le dimorphisme sexuel semble être limité à cette caractéristique.

¹⁶ Espèce chez laquelle les sexes m le et femelle sont individuellement séparés.

Le développement des ormeaux peut se résumer en **cinq phases** : la phase embryonnaire, la phase larvaire, la phase post-larvaire, la phase juvénile et la phase adulte reproductive (Fig. 16).

Chez les ormeaux, la **fécondation est externe**, les individus mâles et femelles libèrent donc dans l'eau environnante leurs gamètes. Chez *H. tuberculata*, la temporalité de la ponte dépend fortement de la distribution géographique et de la latitude (Hayashi, 1980). Hayashi a révélé un **asynchronisme de la ponte** chez des populations d'ormeaux européens situées à de faibles distances les unes des autres. Cette variabilité montre l'influence majeure des paramètres du milieu dans la période de ponte des ormeaux. Le développement de la gonade et la maturation des gamètes chez les ormeaux semblent être notamment contrôlés par la température, la photopériode et la disponibilité en nourriture (Girard, 1972; Cochard, 1980; Hayashi, 1980; McAvaney *et al.*, 2004) .

La fécondation s'accomplit lorsque le gamète mâle pénètre la membrane de l'œuf jusqu'à la couche vitelline et fusionne avec la membrane plasmatique (Hahn, 1989). L'apparition du corps polaire est caractéristique du succès de la fécondation et intervient dès les premières minutes (Koike, 1978). Les œufs fécondés, plus denses que l'eau, gravitent vers le substrat. Suite à la fécondation, une succession de divisions mitotiques caractéristiques de la **phase embryonnaire** mène, après quelques heures, à la formation des stades embryonnaires *morula*, *blastula* puis *gastrula* (Crofts, 1937; Bevelander, 1988). L'architecture du corps du futur adulte est alors établie, les lignées cellulaires sont différenciées et l'organogenèse peut débuter (Crofts, 1937). La phase embryonnaire aboutit à la formation d'une **larve trochophore** ciliée et lécitotrophe (Crofts, 1937; Hahn, 1989). La larve trochophore précoce érige une zone ciliée sous la membrane embryonnaire, la prototroque, qui sert à sa locomotion et à sa rotation au sein du vitellus¹⁷ (Crofts, 1937). Les prémices de la cavité buccale et des organes sensoriels s'établissent par la formation d'une zone apicale ciliée et de l'ocelle composé de pigments photosensibles. Après 24 heures, la membrane de l'œuf se rompt suite aux multiples retournements de la larve qui devient alors pélagique¹⁸. La sécrétion de la coquille débute au niveau d'un organe postérieur dérivé du manteau alors que la masse viscérale se configure (Jardillier *et al.*, 2008). La formation de cette masse

¹⁷ Réserves énergétiques utilisables par les larves et embryons durant le développement larvaire ou embryonnaire.

¹⁸ Libre dans la colonne d'eau.

viscérale, de la coquille, du tissu du pied et des lobes ciliés du vélum¹⁹ caractérisent la transformation de la larve trochophore en **larve véligère** (Fallu, 1991). Au stade véligère, une fixation tégumentaire attache la masse viscérale à la coquille au niveau du futur muscle rétracteur. Des torsions de la masse céphalo-pédieuse et du vélum interviennent et initient la position finale des organes. Chez *H. tuberculata coccinea*, la formation de la coquille larvaire est alors accomplie (Courtois de Vicose *et al.*, 2007). Le pied, les tentacules épipodiaux, l'*operculum* et le coeur se développent. Le vélum se scinde en 2 parties au niveau desquelles les prémices des tentacules céphaliques et des yeux apparaissent de part et d'autre de la scission. La larve est capable d'apprécier son environnement et de jouer sur sa capacité de rétraction.

Au terme du développement de la larve véligère, la transition entre la phase planctonique et la **phase benthique**²⁰ s'entreprind. La larve est à présent apte à utiliser son muscle pédieux pour ramper et explorer la surface d'un possible site de fixation. Lorsqu'elle s'établit, le vélum s'atrophie et marque la fin de la phase pélagique. L'alimentation par le biais d'une *radula* fonctionnelle est possible immédiatement après la fixation (Mgaya, 1995). Une seconde phase de torsion de la larve survient et caractérise la métamorphose de l'animal en sa forme benthique et la fin de la phase larvaire. Le pied s'étend, le manteau recouvre la masse viscérale sous la coquille qui se forme de concrétions calcaires et se perce des premiers pores respiratoires. **La phase post-larvaire** est caractérisée par une vie benthique et une alimentation basée principalement de diatomées et d'algues encroûtantes (Kawamura *et al.*, 1998). Le développement du système digestif est alors incomplet et évoluera jusqu'à la transition vers le stade juvénile (Kawamura *et al.*, 2001; Takami et Kawamura, 2003).

La phase juvénile, non reproductive, débute avec la transition alimentaire vers un régime composé majoritairement de macroalgues, et se poursuit par une augmentation du nombre de pores respiratoires et de tentacules épipodiaux, et une coloration de la coquille (Koike, 1978). Enfin, la **phase adulte** est marquée par le développement conséquent de la gonade, généralement en fin de deuxième année chez *H. tuberculata*.

¹⁹ Structure tissulaire multilobée qui sert à la nage et à la collecte des particules alimentaires.

²⁰ Ce dit d'un organisme fixé sur le substrat.

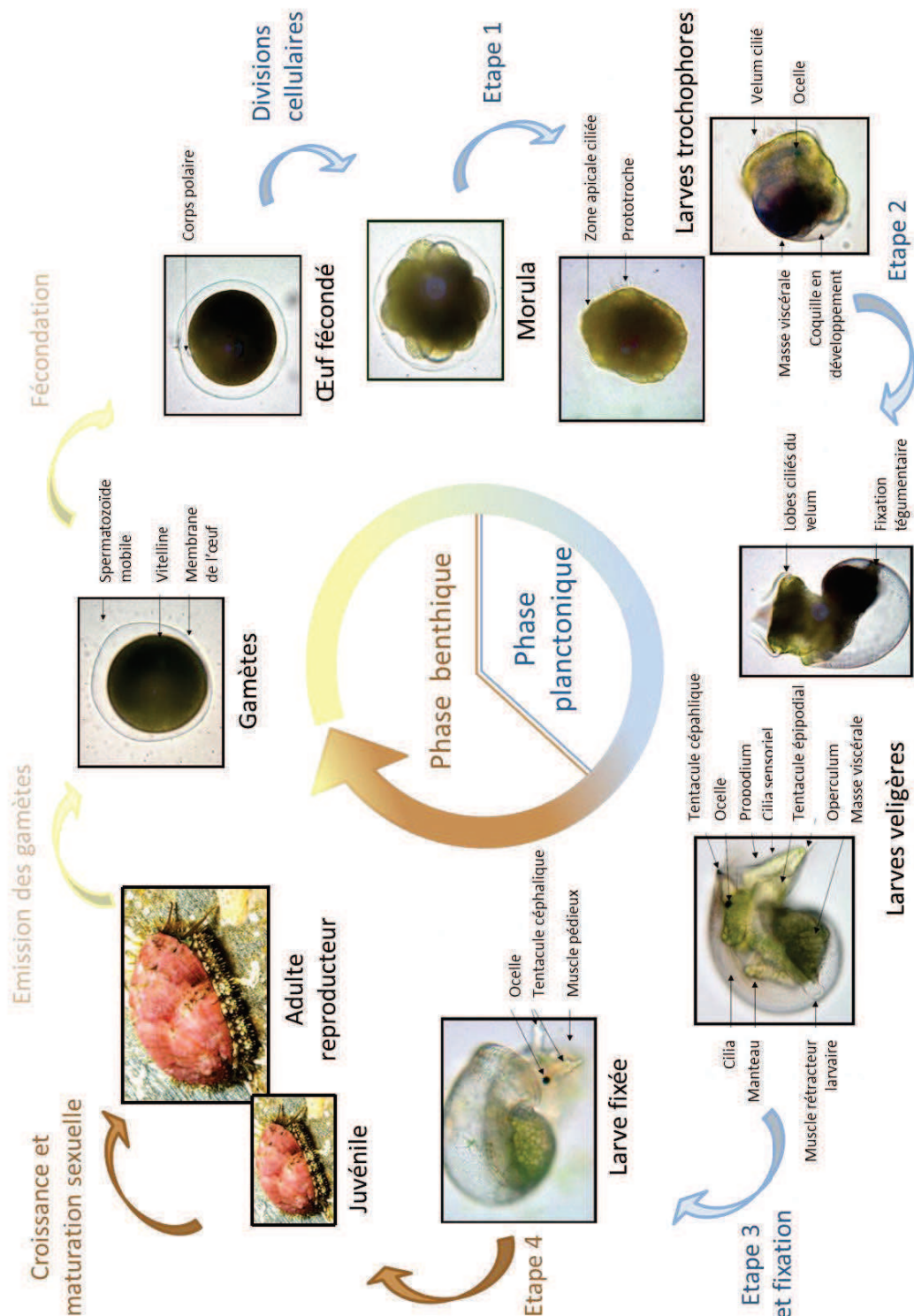


Figure 16 : Etapes du développement des ormeaux. Les photographies sont issues de Gorski, 2006 et concerne l'espèce *H. rubra*. Le cycle de développement de l'ormeau *H. tuberculata* est spécifiquement référencé par les travaux de Courtois de Viçose et collaborateurs, 2007.

Etape 1 : passage de la phase embryonnaire à la phase larvaire ; étape 2 : transformation de la larve trochophore en larve véligère ; étape 3 : passage de la phase planctonique à la phase benthique par fixation de la larve véligère ; étape 4 : fin de la phase larvaire et passage au stade juvénile.

C- Les maladies des ormeaux et agents pathogènes

Le terme « maladie » se réfère, par définition, à une perturbation du fonctionnement d'un organe, d'un système ou de toute partie d'un organisme, et se caractérise par un groupe de signes ou symptômes. Une maladie résulte généralement de l'effet combiné de **facteurs biotiques et abiotiques** : présence d'agents pathogènes, patrimoine génétique et/ou condition physiologique de l'hôte, facteurs environnementaux particuliers ou contraignants, etc... Diverses maladies infectieuses ont été recensées chez différentes espèces d'ormeaux (Tableau 3), dont les plus préjudiciables pour les populations sont les maladies virales dues à un virus de type herpes, les rickettsioses et les vibrioses. Ces maladies peuvent avoir un réel impact sur la **production halioticole** et sur la **conservation de ces espèces**, notamment en ce qui concerne *H. tuberculata* (Huchette et Clavier, 2004).

De nombreux cas de **parasitoses** ont été observés chez les ormeaux (Tableau 3) et sont notables par la diversité biologique des agents parasites responsables, des stades de développement affectés et des organes ciblés chez les ormeaux. Chez *H. tuberculata*, quatre parasitoses ont été rapportées, attribuées à un protiste Haplosporidiidae: *Haplosporidium montforti*, à une éponge du genre *Cliona*, à un trématode Digenea et à un polychète perforant du genre *Polydora* (Clavier, 1992; Bower, 2002; Azevedo *et al.*, 2006a). Les parasites *Cliona celata* et *Polydora sp.*, observés par Clavier (1992), sur des coquilles d'adultes de plus de 5 cm, ne semblent pas avoir d'incidence majeure sur l'état physiologique global des ormeaux. Cependant, l'altération et la fragilisation de la coquille par le polychète *Polydora* favoriserait leur prédation (Fig. 17). Peu de données sont disponibles sur la parasitose due aux trématodes chez *H. tuberculata*. Celles recueillies par Bower (2002) tendent à montrer que l'intensité de cette maladie reste généralement limitée, ne provoquant pas de mortalité, mais pourrait inhiber le développement gonadique chez certains individus. Chez l'ormeau européen, l'intégralité du cycle de développement du parasite *Haplosporidium montforti*, décrit par Azevedo et collaborateurs, s'accomplit dans les tissus conjonctifs des branchies, du muscle et de la glande digestive (Azevedo *et al.*, 2006a) (Fig. 17). Aucun cas de parasitose due au parasite *Perkinsus sp.* n'a pu être mis en évidence chez cette espèce, malgré des tests d'infestation réalisés avec *P. olseni* à la station Ifremer de La Tremblade par Schikorski et collaborateurs (Schikorski *et al.*, in press).

La **rickettsiose**²¹ des ormeaux est associée à la maladie létale dénommée « Withering syndrome » et attribué à l'espèce *Candidatus xenohaliotis californiensis* décrites par Gardner *et al.*, 1995, et Friedman *et al.*, 2000, chez *H. cracherodii*. La rickettsie mise en cause cible, dans un premier temps, l'épithélium du tractus digestif au niveau duquel elle s'accumule en colonies intracellulaires. La deuxième étape de la maladie réside en l'altération des fibres musculaires, la réduction du nombre de cellules immunitaires et l'altération de leur morphologie, bien que l'agent pathogène ne soit détecté ni dans le muscle ni dans l'hémolymphe. Deux études témoignent de l'observation de rickettsioses chez l'ormeau européen (Azevedo *et al.*, 2006b; Balseiro *et al.*, 2006), chez lequel *Candidatus xenohaliotis californiensis* a été retrouvé dans la lumière du tube digestif de juvéniles présentant des mortalités inexplicables (Balseiro *et al.*, 2006) (Fig. 17).

D'autres **bactérioses** imputables à des bactéries marines ou estuariennes ont été rapportées chez les ormeaux. La majorité de ces maladies sont induites par des bactéries du genre *Vibrio*. Les **vibrioses** des ormeaux due aux vibrions du clade *Harveyi* seront exposées ultérieurement, dont celle observée chez *H. tuberculata* et imputable à *V. harveyi* (Nicolas *et al.*, 2002).

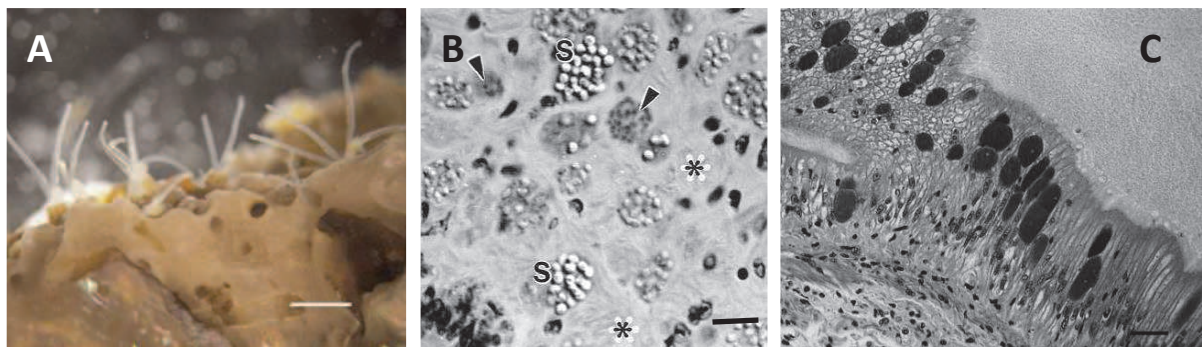


Figure 17 : Exemples de maladies chez l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*.

A : Région antérieure de *Polydora sp.* dans une coquille d'ormeau altérée (Sato-Okoshi *et al.*, 2008), la barre correspond à 1 mm ;

B : Spores d'*Haplosporidium montforti* (S) dans le tissu musculaire d'un ormeau européen (Azevedo *et al.*, 2006a), la barre correspond à 20 μ m ;

C : *Candidatus Xenohaliotis californiensis* infectant les cellules de l'épithélium gastro-intestinal chez l'ormeau européen (Balseiro *et al.*, 2006), la barre correspond à 25 μ m.

²¹ Maladie due aux procaryotes de type rickettsie.

Tableau 3 : Maladies infectieuses recensées chez les ormeaux.

Les agents pathogènes responsables, l'espèce d'ormeau affectée, le stade de développement et les organes ciblés par l'agent pathogène sont indiqués lorsque ces données sont publiées.

Maladies / agent pathogène	Espèce	Stade(s)	Organe(s)	Références	
Parasitoses	Labyrinthulea	juvénile juvénile	muscle, tête puis tous les tissus	Bower et al., 1987, 1989 et 2003 Bower et al., 1987	
	Conoidasida sous-classe coccidia			Friedman et al., 1993 et 1995 Friedman et al., 1993 et 1997 Caceres-Martinez et al., 2001 Diggles et Oliver, 2005 Bower, 2006 Bower, 2006 Bower, 2006	
Protistes	Perkinsea genre <i>Perkinsus</i>			Lester et Davis, 1981 Goggin et Lester, 1995 Bower, 2010 Bower, 2010	
	Ciliophora			Caceres-Martinez et al., 2001 Diggles et Oliver, 2005 Bowes, 2006 Bowes, 2006 Bowes, 2006	
	Ascetosporea sous-classe Haplosporidiidae	adulte	tractus digestif puis tous les tissus	Hine et al., 2002 et Diggles et al., 2002 Azevedo et al., 2006 et 2008	
	Kinetoplastida genre <i>Cryptobia</i>	adulte	branchies, hémolymph	Chen et al., 2004	
	Demospongiae genre <i>Cliona</i>	adulte	coquille	Clavier, 1992	
	Phoronida	adulte		Aviles et al., 2007	
	Trematoda sous-classe digenea			Bower, 2002 Bower, 2002 Bower, 2002 Lucas et al., 2005	
	Plathelminthes		adulte	gonade, pied, glande digestive, branchies	Millermann, 1951 Bower, 2001
		Nematoda famille <i>gnathostomidae</i>	adulte	muscle	Oakes et Fields, 1996 ; Moore et al., 2007
	Annélides	Polychaeta canalipalpa sous-ordre Sabellida			Kuris, 1996 Kuris, 1996 Sales et Britz, 2001; Simon et al., 2004 Aviles et al., 2007
Polychaeta famille Spionidae		<i>H. rufescens</i>	juvénile et adulte	coquille et branchies	Naylor et McShane, 1997
		<i>H. fulgens</i>			Clavier, 1992
		<i>H. corrugata</i>			Caceres-Martinez et Tinoco-Orta, 2001
		<i>H. midae</i>			McDiarmid et al., 2004
		<i>H. discus hannai</i>			McDiarmid et al., 2004 ; Sato-Okoshi et al., 2008
		<i>H. iris</i>	larve		Radashevsky et Olivares, 2005
		<i>H. tuberculata</i>			Simon et al., 2006
		<i>H. rufescens</i>			Sato-Okoshi et al., 2008
		<i>H. rubra</i>			Sato-Okoshi et al., 2008
		<i>H. laevigata</i>	adulte	coquille	Sato-Okoshi et al., 2012
<i>H. discus hannai</i>				Caceres-Martinez et Tinoco-Orta, 2001	
<i>H. midae</i>			Naylor et McShane, 1997		
<i>H. roei</i>					
<i>H. conicopora</i>					
<i>H. discus discus</i>					
<i>H. rufescens</i>	adulte	coquille			
<i>H. iris</i>	larve				

Maladies / agent pathogène	Espèce	Stade(s)	Organe(s)	Références
Viroses				
Sphérovirus	<i>H. diversicolor aquatilis</i> <i>H. diversicolor supertexta</i> <i>H. diversicolor</i> <i>H. discus hannaï</i>	tous adulte adulte juvénile	glande digestive, intestin, parfois rein tous les tissus hémocytes	Song et al., 2000 Zhang et al., 2001 Wang et al., 2004 Li et al., 1998 ; Wang et al., 1997
Herpès-like	<i>H. diversicolor supertexta</i> <i>H. laevigata</i> <i>H. rubra</i>	adulte	système nerveux	Chang et al., 2005 Hooper et al., 2007 ; Tan et al., 2008 Hooper et al., 2007 ; Tan et al., 2008
Retrovirus-like	<i>H. discus discus</i>	juvénile	système nerveux	Otsu and Sasaki, 1997 ; Nakatsugawa et al., 1999
Rickettsioses				
<i>Candidatus Xenohaliotis californiensis</i>	<i>H. cracherodii</i> <i>H. rufescens</i> <i>H. tuberculata</i> <i>H. diversicolor supertexta</i> <i>H. discus hannaï</i> <i>H. corrugata</i> <i>H. fulgens</i> <i>H. tuberculata</i> <i>H. diversicolor supertexta</i> <i>H. midae</i>	juvénile et adulte	tractus digestif	Gardner et al., 1995 ; Friedman et al., 2000 Moore et al., 2000 Balseiro et al., 2006 Wetchateng et al., 2010 Gonzalez et al., 2012 Tinajero et al., 2002 Tinajero et al., 2002 Azevedo et al., 2006 Chang et al., 2008 Mouton et Gummow, 2011
<i>Rickettsia</i> -like prokaryotes				
Vibrioses				
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>H. rufescens</i> <i>H. diversicolor supertexta</i>	tous	manteau, système nerveux	Elston et Lockwood, 1983 ; Anguiano-Beltran et al., 1998 Liu et al., 2000 ; Lee et al., 2001 ; Cai et al., 2006
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>H. diversicolor supertexta</i>	post-larve et adulte		Huang et al., 2001 ; Lee et al., 2001 et 2003 ; Cai et al., 2006 et 2007 ; Cheng et al., 2008
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>H. diversicolor supertexta</i> <i>H. discus hannaï</i> <i>H. tuberculata</i> <i>H. ruber</i>	adulte	branchies, hémolymphe	Nishimori et al., 1998 Sawabe et al., 2007 Nicolas et al., 2002, Travers et al., 2009 Bower, 2010
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>H. discus hannaï</i>	adulte	muscle et hémocytes	Li et al., 1998
Autres bactérioses				
Firmicute	Clostridia genre <i>Clostridium</i>			Dixon et al., 1991
Gram négatif	Enterobacteria genre <i>Klebsiella</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Francisella haliotida</i> Exiguobacterium sp	post-larve post-larve post-larve		Cai et al., 2008 Cai et al., 2009 Brevik et al., 2011 Anguiano-Beltran, et al., 2012
Mycose				
Type inconnu	<i>Haliotis</i> spp.	adulte	coquille	Grindley et al., 1998
Maladie coquillière				
Type inconnu	<i>Haliotis tuberculata</i>	adulte	coquille	Huchette et al., 2006

D- Immunité et système immunitaire

La fonction physiologique de **défense de l'organisme** est principalement assurée par le système immunitaire. Ainsi, de l'efficacité du système immunitaire dépend la survie de cet organisme et le contrôle des invasions pathogènes. Chez les invertébrés, il est admis actuellement que leur immunité repose sur un **système inné et non adaptatif**, basé sur deux types de réponses, une réponse cellulaire et une réponse humorale. La réponse cellulaire requiert le fonctionnement des cellules du système circulatoire ou **hémocytes**, tandis que la réponse humorale s'effectue *via* la production et le relargage dans la matrice extracellulaire d'**effecteurs solubles**. Peu d'études se réfèrent au fonctionnement du système immunitaire chez les ormeaux, la suite de cette partie s'efforcera donc de faire le parallèle entre les données acquises chez d'autres mollusques et les connaissances disponibles sur l'immunité des ormeaux ou des gastéropodes.

1. Fonctionnement du système immunitaire

Le mécanisme immunitaire majeur, décrit chez les invertébrés, implique le processus de **phagocytose**, qui vise à éliminer toute particule de petite taille (débris, virus, bactéries, etc...) et reconnue comme non-soi (Bayne, 1990). Ce processus est réalisé par des cellules hémocytaires, qui circulent librement dans le système circulatoire ou hémolymph. Différents types d'hémocytes différenciés sont généralement observés chez les mollusques, selon leurs caractéristiques morphologiques : les granulocytes et les hyalinocytes. Chez *H. tuberculata*, les hyalinocytes semblent être largement majoritaires et des granulocytes n'ont pu être détectés qu'en coupes histologiques (Travers *et al.*, 2008c).

Le processus de phagocytose se décompose en plusieurs étapes : une étape de reconnaissance de la particule étrangère *via* l'action de molécules spécifiques, une étape d'attachement et d'internalisation de la particule, une étape de dégradation intracellulaire et enfin une étape d'évacuation des molécules et débris résiduels (Fig. 18).

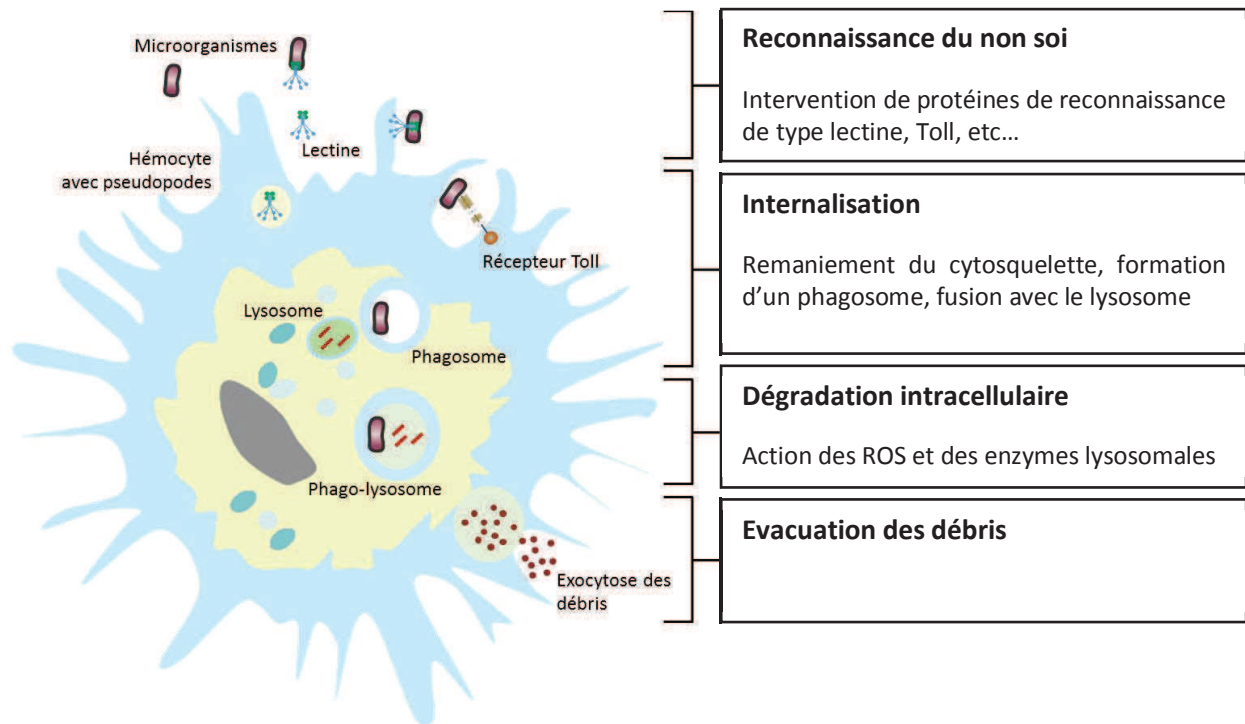


Figure 18 : Schéma hypothétique des étapes du processus de phagocytose (adapté de Campbell et Reece, 2007; Soudant *et al.*, 2008 et Parham, 2009).

a. La phase de reconnaissance du non soi

L'initiation de la réponse cellulaire implique la reconnaissance, *via* des **protéines spécifiques** (« pattern recognition protein » ou PRP), de motifs moléculaires associés aux microorganismes (« pathogen-associated molecular patterns » ou PAMP). Ces **PAMP** sont des constituants membranaires généralement conservés chez les microorganismes et absents chez leurs hôtes (Medzhitov et Janeway, 1997). Parmi les PRP, les protéines de liaison avec les lipopolysaccharides (LPS) et peptidoglycans bactériens et le beta-1,3-glucan jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance et l'opsonisation²². Nikapitiya et collaborateurs ont mis en évidence l'existence, au sein du génome de l'ormeau *H. discus discus*, d'un gène codant pour une protéine de 45 kDa qui présente 50% d'homologie avec une PRP du gastéropode *Biomphalaria glabrata*. L'expression de ce gène est surexprimé suite à une injection d'une suspension de *V. alginolyticus*, de lipopolysaccharides et de beta-1,3-glucan, ce qui suggère son implication dans le système immunitaire des ormeaux (Nikapitiya *et al.*, 2008).

²² Recouvrement de la surface d'une particule étrangère afin de favoriser sa phagocytose, des bactéries Gram négatif, positif et des mycètes

Au sein des invertébrés, d'autres PRP ont pu être identifiées, notamment de type **lectine** (Malagoli *et al.*, 2010). Les lectines sont des protéines circulantes ou membranaires qui possèdent la propriété de pouvoir se lier aux sucres présents à la surface des particules étrangères, facilitant ainsi leur reconnaissance par les hémocytes et leur phagocytose. Chez les ormeaux, une seule étude évoque l'identification d'un gène codant pour une protéine de type lectine. La transcription de ce gène est induite, chez *H. discus discus*, après contact avec *Vibrio alginolyticus*, et la protéine recombinante produite chez *Escherichia coli* favorise l'agglutination²³ des bactéries pathogènes (Wang *et al.*, 2008c).

Enfin, les **récepteurs de type Toll** (« Toll-like receptors » ou TLR) sont également aptes à détecter la présence de PAMP. Ces protéines intramembranaires sont synthétisées en réponse à de nombreux stimuli dont la présence de molécules PAMP. Pendant la phagocytose, les TLR sont recrutés dans les phagosomes dans lesquels ils déterminent la nature de la particule ingérée et participe donc à la formulation d'une réponse immunitaire et inflammatoire appropriée. Aucune molécule de type TLR n'a été identifiée à ce jour ni chez les ormeaux, ni chez les gastéropodes.

b. La transduction du signal

De nombreuses études tendent à montrer que la réponse immunitaire innée des invertébrés, dont les mollusques, pourrait être modulée par le biais des **cytokines**, de manière similaire aux vertébrés (Ottaviani *et al.*, 2004). Les cytokines sont des petites protéines glycosylées ou non, sécrétées par divers types cellulaires, dont les cellules immunitaires, et impliquées dans la communication intercellulaire. Des gènes codant pour des protéines présentant des homologies de structure avec les cytokines de vertébrés ou avec les récepteurs de cytokines ont été identifiés chez les mollusques (Beschlin *et al.*, 2001). Parmi ces cytokines, les **ligands de type TNF** (pour « Tumor Necrosis Factor ») sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires chez les vertébrés, tels que la fonction immunitaire, l'apoptose, la différenciation et prolifération cellulaires, etc... (Goetz *et al.*, 2004). De Zoysa et collaborateurs ont mis en évidence 2 gènes, **AbTNF- α** et **AbFas**, codant pour des protéines qui présentent des homologies de structure avec des TNF humains, chez l'ormeau *H. discus*

²³ Immobilisation cellulaire de parasites évitant ainsi leur dissémination.

discus (De Zoysa *et al.*, 2009a; De Zoysa *et al.*, 2009b). L'expression de ces deux gènes est stimulée suite à l'injection intramusculaire d'une suspension contenant des bactéries appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* et *Lysteria monocytogenes*, un virus de type VHSV et des LPS. La protéine recombinante AbFas synthétisée chez *E. coli* et purifiée semble induire la production de molécules réactives de l'oxygène (ROS) (De Zoysa *et al.*, 2009b). Ces résultats suggèrent l'existence au sein du genre *Haliotis* de protéines de type TNF impliquées dans la réponse immunitaire.

Les **récepteurs membranaires des TNF** (« TNF-receptor-associated factors » ou TRAF) activent les voies de transduction du signal intracellulaires, notamment basées sur l'activité de kinases particulières, les **MAPK** (pour « mitogen-activated protein kinases ») ou sur l'induction de facteurs de transcription de type **Rel/NF- κ B** (pour « nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») (Baud et Karin, 2001) (Fig. 19). Ces deux voies de signalisation régulent l'expression de gènes de la réponse cellulaire et immunitaire. Des gènes codant pour des homologues de protéines impliquées dans la voie de signalisation Rel/NF- κ B ont été identifiés chez les ormeaux. Jiang et Wu ont notamment caractérisé le gène d'une protéine homologue du Rel/NF- κ B chez *H. diversicolor supertexta*, protéine qui semble être synthétisée de manière ubiquiste et constitutive et dont l'activité est induite chez des ormeaux injectés par une solution contenant des LPS (Jiang et Wu, 2007). Chez *H. discus discus*, les gènes codant pour un homologue du facteur de transduction TNF induit par les lipopolysaccharides (« lipopolysaccharide-induced TNF- α factor » ou LITAF), **AbLITAF**, et un homologue du facteur de transcription Rel/NF- κ B, **AbRel/NF- κ B**, ont été mis en évidence et montrent également une expression ubiquiste et constitutive (De Zoysa *et al.*, 2010b). En cas d'injection intramusculaire d'une suspension contenant des bactéries appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* et *L. monocytogenes*, un virus de type VHSV et des lipopolysaccharides, AbLITAF est surexprimé alors que l'expression de AbRel/NF- κ B ne semble pas être régulée, ce qui suggère leur implication dans deux voies de signalisation différentes.

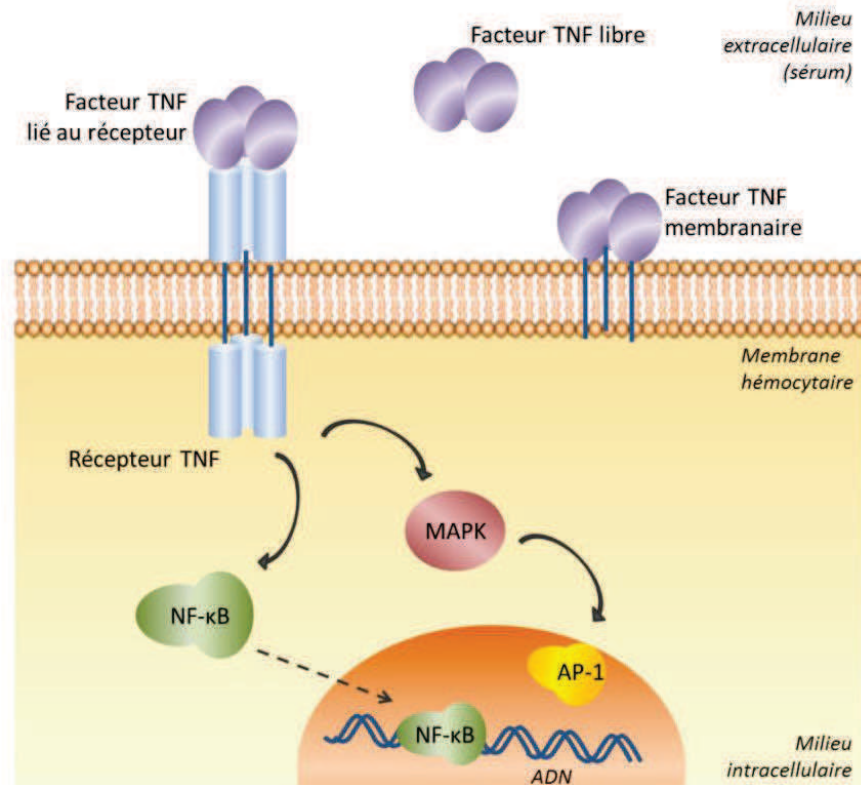


Figure 19 : Schéma simplifié de l'activation des voies de transduction du signal par le facteur TNF chez l'Homme (adapté de Palladino *et al.*, 2003).

Le facteur TNF libre se fixe sur son récepteur, ce qui active les voies de signalisation NF-κB et MAPK et induit la transcription de gènes impliqués dans l'immunité *via* deux facteurs de transcription : NF-κB et AP-1.

La voie des MAPK nécessite l'activité de **kinases à serine et thréonine** impliquées dans divers processus cellulaires, dont le cycle cellulaire, le contrôle du développement, la réponse au stress et les mécanismes immunitaires. Peu d'études se réfèrent au fonctionnement de cette voie de signalisation chez les gastéropodes. Chez *Littorina littorea*, l'activité de MAPK est modulée par l'exposition aux **facteurs contraignants** tels que la privation d'oxygène et le froid, ou aux molécules caractéristiques d'**agents pathogènes** de type LPS, polysaccharides de levure, ou aux produits de sécrétion de trématodes (Iakovleva *et al.*, 2006; MacDonald et Storey, 2006). Chez les gastéropodes *Biomphalaria glabrata* et *Lymnaea stagnalis*, la voie des MAPK semble être primordiale dans les processus de division cellulaire et de défense tels que la production de ROS et la phagocytose (Zelck *et al.*, 2007; Humphries et Yoshino, 2008; Salamat et Sullivan, 2009). Par ailleurs, la perturbation de l'activité des MAPK semble être une **stratégie de virulence** utilisée par certains agents pathogènes chez les gastéropodes, tel que cela a été démontré dans les cas d'interaction *Biomphalaria glabrata* /

Schistosoma mansoni et *H. tuberculata* / *V. harveyi* (Zahoor *et al.*, 2008; Travers *et al.*, 2009b). De Zoysa et collaborateurs ont également identifié le gène d'une protéine homologue au **facteur de transcription AP-1** (pour « activator protein 1 »), relié à la voie MAPK, dont l'expression augmente suite à l'injection intramusculaire d'une suspension contenant des bactéries appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* et *Lysteria monocytogenes*, ou d'une suspension de virus de type VHSV, dans les branchies et hémocytes d'ormeaux *H. discus discus* (De Zoysa *et al.*, 2010a).

c. La phagocytose : internalisation et dégradation

L'**internalisation** des particules piégées au niveau membranaire se réalise par **remaniement du cytosquelette** et induit la formation d'un organite particulier, le **phagosome**. A l'intérieur du cytoplasme cellulaire, le phagosome fusionne avec le **lysosome**, organite pourvu d'enzymes hydrolytiques et cytotoxiques. Cette fusion donne naissance au **phagolysosome** dans lequel la dégradation intracellulaire de la particule pourra s'opérer (Fig. 18).

La dégradation intra-hémocytaire des particules et microorganismes internalisés implique généralement la **production de ROS** et l'induction de l'activité des **enzymes lysosomales** (Tiscar et Mosca, 2004). Les ROS sont des espèces chimiques oxygénées, initialement produites par l'activation d'enzymes de type NAD(P)H oxydases au niveau de la membrane des phagolysosomes, qui possède un fort pouvoir microbicide et cytotoxique. Une seule étude évoque le fonctionnement de la phagocytose chez les gastéropodes, et met en relation la production intracellulaire de ROS avec l'intensification du processus de phagocytose chez *Lymnaea stagnalis* (Adema *et al.*, 1991). Tout organisme producteur de ROS doit disposer d'effecteurs afin de se prémunir de leurs effets cytotoxiques, tels que des enzymes « **ROS-scavangers** » de type superoxyde dismutase (SOD), catalase, peroxydases ou transférases. Certains gènes codant pour des protéines homologues de ces enzymes ont pu être identifiés chez les espèces d'ormeaux *H. discus* et *H. diversicolor* et leur expression est régulée en présence de ROS ou d'agents pathogènes (Ekanayake *et al.*, 2006; De Zoysa *et al.*, 2008; Ekanayake *et al.*, 2008; Pushpamali *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010).

Chez les invertébrés marins, les enzymes lysosomales (b-glucuronidases, phosphatases acides ou alcalines, lipase, aminopeptidases, etc...) sont intégrées dans les lysosomes et diffusées dans l'hémolymphe lors de la dégranulation des cellules en fin du processus phagocytaire (Pipe, 1990). La présence d'enzymes lysosomales au sein des hémocytes a également été mise en évidence chez les gastéropodes *Biomphalaria glabrata*, *Clithon retropictus* et *Lymnaea stagnalis* (Granath et Yoshino, 1984; Kumazawa *et al.*, 1991; Mohandas *et al.*, 1992). Seule l'étude de Wang et collaborateurs relate la modulation de l'activité d'enzymes lysosomales de type phosphatase dans le sérum²⁴ d'ormeaux *H. diversicolor supertexta* suite à une injection intramusculaire d'une suspension de *V. parahaemolyticus* (Wang *et al.*, 2004b). Cependant, la faible activité mesurée de ces enzymes suggère aux auteurs leur implication modérée dans le processus immunitaire des ormeaux.

Après dégradation, les débris résiduels des particules sont évacués vers la matrice extracellulaire. Lorsque la particule est trop volumineuse pour être phagocytée notamment dans le cas d'infestations parasitaires, les hémocytes se disposent autour de la particule et la piègent. Les effecteurs immunitaires sont alors sécrétés et la dégradation se réalise dans la matrice extracellulaire. Chez le gastéropode d'eau douce *Biomphalaria glabrata*, ce mécanisme d'**encapsulation** a été observé en cas d'infestations par le trématode *Schistosoma mansoni* et est directement induit par l'activation de la voie des MAPK (Zelck *et al.*, 2007).

d. Autres effecteurs potentiels de la réponse humorale

Chez les invertébrés, la réponse humorale fait intervenir la **production de ROS** préalablement décrite, la synthèse de **peptides antimicrobiens** ou d'**inhibiteur de protéases** et l'activation de la cascade enzymatique de la **mélanisation** (Perez et Fontanetti, 2011).

²⁴ Hémolymphe privée des hémocytes.

Les peptides antimicrobiens (« antimicrobial peptides » ou AMP) constituent un groupe de molécules diverses dans leur structure, composition et fonctionnalité, et ont été mises en évidence au sein de la majorité des *phyla* biologiques. Généralement, ces peptides sont composés de moins de 50 acides aminés et présentent des **résidus hydrophobes** caractéristiques. Les AMP possèdent des capacités cytotoxiques envers un large spectre de microorganismes, dont les bactéries gram positif et négatif, les levures, les mycètes, les virus, les protozoaires et les parasites (Lopez-Abarrategui *et al.*, 2012). Leur activité microbicide ou cytotoxique repose sur 2 stratégies : soit ils forment un pore au sein de la membrane cellulaire et génèrent un déséquilibre osmotique qui conduit à la **lyse cellulaire**, soit ils pénètrent la membrane cellulaire et perturbent le fonctionnement ou la synthèse intracellulaires de **composés essentiels** (pour revue Brogden, 2005). L'apparition de résistance aux antibiotiques actuellement utilisés, chez des souches bactériennes pathogènes de l'Homme, et la recherche de nouvelles molécules à activité microbicide ont favorisé les études sur les AMP. A ce jour, une quarantaine d'AMP a été identifiée chez les invertébrés marins. Cette diversité moléculaire s'explique par le fait qu'une espèce dispose d'un large panel d'AMP qui peuvent être synthétisés sous forme d'isoformes à partir d'un même transcrit (pour revue Sperstad *et al.*, 2011). Chez les gastéropodes, le premier AMP référencé a été détecté chez l'escargot terrestre *Achatina fulica* (Iguchi *et al.*, 1982; Kubota *et al.*, 1985). Récemment, d'autres AMP ont également pu être mis en évidence chez les gastéropodes marins notamment chez la littorine *Littorina littorea* (Defer *et al.*, 2009). Dolashka et collaborateurs ont caractérisé 11 nouveaux AMP chez le gastéropode *Rapana venosa*, parmi lesquels quatre possèdent une activité bactéricide (Dolashka *et al.*, 2011). Un peptide de 1485.26 Da présentant une action fongicide et bactéricide a également été isolé et purifié chez l'escargot marin *Cenchritis muricatus* (Lopez-Abarrategui *et al.*, 2012). Chez les ormeaux, trois gènes codant pour des AMP potentiels ont été identifiés à ce jour, chez *H. discus hannai* et *H. discus discus* (Hong *et al.*, 2008; De Zoysa *et al.*, 2009c). Les deux premiers gènes, codant pour deux peptide de type **défensine**, sont surexprimés dans la glande digestive en cas de contact avec des bactéries gram positif ou négatif et suite à l'injection intramusculaire d'une suspension contenant des bactéries appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* et *L. monocytogenes*, ce qui suggère leur potentialité en tant qu'effecteur antibactérien et/ou nutritionnel (Hong *et al.*, 2008; De Zoysa *et al.*, 2010c). Le second gène, dénommé **Abhisin**, code pour une protéine de 40

acides aminés et est surexprimé dans les branchies et le tractus digestif d'ormeaux *H. discus discus*, suite à l'injection intramusculaire d'une suspension contenant des bactéries appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* et *L. monocytogenes*. Le peptide synthétisé à partir de ce gène inhibe la croissance de la bactérie gram positif *L. monocytogenes*, de *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus*, *V. ichthyoenteri* et de la levure *Pityrosporum ovale* (De Zoysa *et al.*, 2009c).

Les inhibiteurs de protéases ("inhibitor protease" ou PI) sont des molécules qui inhibent ou régulent l'activité de protéases potentiellement produites par des agents pathogènes, en interagissant avec leurs sites réactionnels. Deux études ont permis d'identifier des gènes codant pour une protéine inhibitrice de protéases à serine et une protéine inhibitrice de protéases à cystéine chez l'ormeau *H. discus discus* (Nikapitiya *et al.*, 2010; Premachandra *et al.*, 2012). La première protéine, de 44 kDa, contient 12 répétitions du domaine « antistasin » caractéristique des inhibiteurs des protéases de type trypsine, est homologue à celle de l'hydre *H. magnipapillata* (Nikapitiya *et al.*, 2010). Le gène identifié est majoritairement surexprimé dans la glande digestive et les hémocytes suite à une injection intramusculaire d'une suspension contenant des bactéries appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* et *L. monocytogenes*, ce qui peut témoigner de son rôle dans les fonctions immunitaire et nutritionnelle des ormeaux. Le second gène code pour une protéine de 101 acides aminés qui possède un domaine unique de type cystatin, caractéristique des inhibiteurs de protéase à cystéine. L'exposition d'ormeaux à une souche pathogène de *V. parahaemolyticus* stimule l'expression de ce gène dans la branchie, ce qui suggère l'implication de cette protéine dans la réponse immunitaire des ormeaux (Premachandra *et al.*, 2012).

Chez les invertébrés, l'intrusion d'agents pathogènes dans les tissus peut induire leur recouvrement par un dépôt de mélanine afin de prévenir leur dissémination et leur croissance (Cerenius *et al.*, 2010). La **réaction de mélanisation** requiert la fonctionnalité d'enzymes hémocytaires de type **phénoloxydase** qui catalyse l'oxydation de molécules phénoliques en quinones, ensuite polymérisées sous forme de mélanine (Fig. 20). La reconnaissance de particules du non-soi chez les invertébrés, entraîne le clivage protéolytique de la forme non active de la phénoloxydase, la pro-phénoloxydase, par une sérine protéinase (Soderhall et Cerenius, 1998). Son implication dans les processus

immunitaires et de réparation des lésions coquillères a pu être notamment mis en évidence chez la palourde *Ruditapes philippinarum* infectés par *V. tapetis* (Paillard et Maes, 1995). La mesure de l'activité des phénoloxydase a été mise au point chez l'ormeau taiwanais *H. diversicolor supertexta* et chez l'ormeau européen *H. tuberculata* (Cheng *et al.*, 2004a; Travers *et al.*, 2008d).

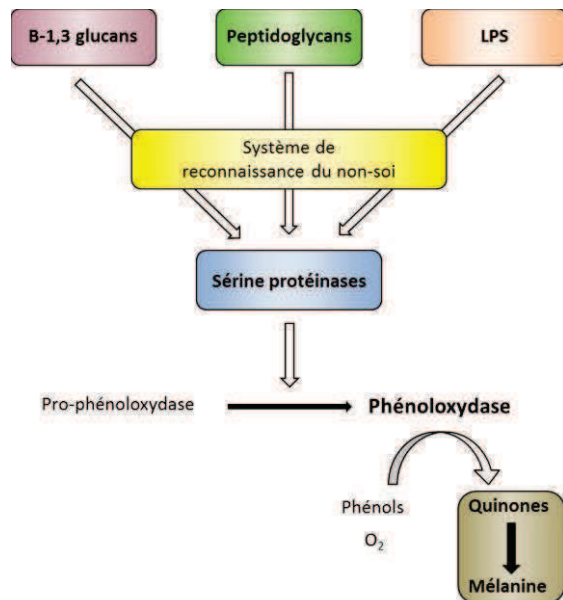


Figure 20 : Schéma de l'activation de la phénoloxydase et de la formation de mélanine chez les invertébrés (adapté de Soderhall et Cerenius, 1998).

LPS : lipopolysachharides ;

O₂ : dioxygène

2. Modulation de l'immunité chez les ormeaux

Plusieurs études tendent à démontrer que le système immunitaire des ormeaux est modulé lors de modifications des conditions environnementales ou physiologiques.

Une série d'études menées par Cheng et collaborateurs a révélé l'impact de facteurs abiotiques sur l'immunité de l'ormeau taiwanais *H. diversicolor supertexta* (Cheng *et al.*, 2004a; Cheng *et al.*, 2004b; Cheng *et al.*, 2004c; Cheng *et al.*, 2004d; Cheng *et al.*, 2004e). Des mesures de paramètres hématocytaires : densité en hémocytes, activité de la phénoloxydase, concentration en ions superoxydes et indice de phagocytose ont été effectuées dans différentes conditions de concentrations en composés organiques, de température, de salinité et d'oxygénation (Tableau 4). Les résultats de ces études montrent la complexité et la spécificité de la réponse immunitaire chez les ormeaux en fonction du facteur abiotique considéré. Une diminution de l'indice de phagocytose semble être, cependant, un marqueur sensible de l'exposition aux conditions stressantes chez les ormeaux.

Tableau 4 : Variations globales des paramètres immunitaires de l'espèce *H. diversicolor* soumis à différentes conditions stressantes (Cheng et al., 2004).

THC : densité en hémocytes, AP : activité de la phénoloxidase, ROS : production d'ions superoxydes, IP : indice de phagocytose.

	↗ ammonium	↗ nitrites	↗ température	↘ salinité	↘ oxygène
THC	↘	↘	=	↗	↘
AP	↘	↗	↘	↘	↗
ROS	↗	↗	↗	↘	↘
IP	↘	↘	↘	↘	↘

Wang et collaborateurs ont également démontré l'influence de l'exposition aux bactéries pathogènes sur l'activité d'enzymes impliquées dans l'immunité chez l'ormeau taiwanais *H. diversicolor supertexta*. Ainsi une augmentation de l'activité des phosphatases, et une réduction de l'activité d'une SOD ont été observées 24h après l'injection d'une suspension de *V. parahaemolyticus* (Wang et al., 2004b). Ces résultats suggèrent qu'en réponse à une infection par *V. parahaemolyticus*, les ormeaux taiwanais modulent l'activité des enzymes lysosomales et antioxydantes.

L'expérience de Hooper et collaborateurs, qui visait à déterminer l'impact de pratiques halioticoles sur l'état immunitaire des ormeaux australiens, a révélé une augmentation de la densité en hémocytes et, une diminution de l'indice de phagocytose et de l'activité antibactérienne chez des ormeaux anesthésiés par une solution éthylique de benzocaïne soumis ou non à des manipulations et retournements (Hooper et al., 2011).

Enfin, une dépression générale de la réponse immunitaire a pu être détectée chez l'ormeau européen dans deux cas : suite à l'exposition à des secousses successives et lors de la période de ponte (Malham et al., 2003; Travers et al., 2008d).

III. Les vibrioses chez les ormeaux

La majorité des vibrioses observées chez les ormeaux sont dues aux espèces *Vibrio* appartenant au clade *Harveyi*, à l'exception de la maladie à pustules ou « Blister disease » attribuée à l'espèce *V. fluvialis*. Cette dernière a été décelée chez l'ormeau *H. discus hannai* chez lequel elle a induit jusqu'à 60% de mortalités dans les stocks d'ormeaux issus de 3 structures aquacoles chinoises (Bower, 2007).

A- Les cas de vibrioses entre des espèces du clade *Harveyi* et des espèces d'ormeaux dans le monde

Les cas de vibrioses recensées chez les ormeaux et imputables aux espèces *Vibrio* du clade *Harveyi*, à savoir *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *V. harveyi* sont référencés dans le tableau 3.

1. Les vibrioses dues à *V. alginolyticus*

Plusieurs études ont rapportées des cas de vibrioses dues à *V. alginolyticus* chez les espèces d'ormeaux *H. rufescens* et *H. diversicolor supertexta*.

Chez l'ormeau rouge, l'espèce a été isolée, une première fois, suite à des mortalités massives de **juvéniles**, en structures aquacoles, et identifiée par immuno-détection dans les tissus lésés (Elston et Wood, 1983). La vibriose était alors caractérisée par une exfoliation épithéliale, la présence d'amas bactériens dans les sinus hémolympatiques et une dégénération du système neural. *V. alginolyticus* ont ensuite été détectés, par méthode biochimique, lors de mortalités massives de **larves véligères** et de **post-larves** issues d'écloseries asiatiques (Anguiano-Beltran *et al.*, 1998). Des essais de reproduction de la maladie en laboratoire montrent que les mortalités surviennent dès 24h après d'inoculation, à des concentrations minimales de 10^5 bactéries/mL chez les larves et 10^6 bactéries/mL chez les post-larves.

Chez *H. diversicolor supertexta*, *V. alginolyticus* a pu être isolé à plusieurs reprises dans l'hémolymphe d'ormeaux **adultes** présentant des **abcès et ulcères au niveau du manteau** (Liu *et al.*, 2001). Lee et collaborateurs ont montré que le développement de cette vibriose est manifeste à des **températures élevées**, approchant 30°C (Lee *et al.*, 2001). L'espèce a également été isolée en structures aquacoles lors de mortalités massives de post-larves, et identifiée par méthode biochimique (Cai *et al.*, 2006b).

2. Les vibrioses dues à *V. parahaemolyticus*

L'espèce est responsable de mortalités massives chez l'ormeau *H. diversicolor supertexta* aux stades **adulte et post-larve**, et isolée pour la première fois par Huang et collaborateurs, chez des adultes souffrant de **mortalités massives**, dans les structures aquacoles taiwanaises (Huang *et al.*, 2001). La reproduction de l'infection montre que les mortalités surviennent après 4 à 7 jours d'inoculation à des températures élevées, proches de 28°C.

L'espèce a également été isolée chez une personne présentant les signes d'une intoxication alimentaire et ayant manipulé des ormeaux contaminés (Lee *et al.*, 2003). La souche isolée et détectée génère des mortalités chez des ormeaux adultes après inoculation. Cette étude relate le seul cas de zoonose²⁵ avérée entre une espèce *Haliotis* et l'Homme.

Plusieurs cas de mortalités chez des post-larves élevées en structure aquacoles chinoises ont été recensés et attribuées à l'espèce après des tests d'identification biochimique et phylogénétique (Cai *et al.*, 2006a; Cai *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008). Les post-larves présentent alors un blanchiment manifeste et souffrent de léthargie (Cai *et al.*, 2007). L'inoculation des souches incriminées ou de leurs protéines extracellulaires reproduit le syndrome de blanchiment et engendre également des mortalités (Cheng *et al.*, 2008).

²⁵ Maladie infectieuse ou infestation parasitaire naturellement transmissible d'une espèce animale à l'Homme et vice versa.

3. Les vibrioses dues à *V. harveyi*

Nishimori et collaborateurs ont isolé pour la première fois, l'espèce *V. carchariae* (espèce assimilée depuis à *V. harveyi* (Gauger et Gomez-Chiarri, 2002)), dans les tissus lésés d'ormeaux adultes *H. diversicolor supertexta*, lors d'un épisode de mortalités massives survenu en structures aquacoles au Japon (Nishimori *et al.*, 1998). Les ormeaux malades présentaient alors une **incapacité à la mobilité et à la fixation**, des **pustules blanches** sur le muscle pédieux, et une dégénération des fibres musculaires.

L'espèce a ensuite été détectée lors de mortalités massives d'ormeaux *H. discus discus* dans des structures aquacoles japonaises, pendant l'été 2002 (Sawabe *et al.*, 2007a). Les animaux morts présentaient des **œdèmes vasculaires** à partir desquels *V. harveyi* a pu être isolé, puis identifié par des méthodes phylogénétiques. Les ormeaux inoculés par injection ou par balnéation²⁶ avec une suspension de la souche incriminée présentent les symptômes de la maladie et souffrent également de mortalités. L'observation microscopique d'ormeaux mis en contact avec cette souche pendant 48h montre une accumulation de bactéries au niveau des lamelles branchiales (Sawabe *et al.*, 2007a).

L'espèce a également été isolée chez l'ormeau européen *H. tuberculata* suite à des mortalités massives observées sur le littoral français. L'état des connaissances sur la vibriose de l'ormeau européen sera évoqué dans le paragraphe ci-après.

B- La vibriose chez l'ormeau européen

A la **fin des années 90**, des mortalités inexplicables d'ormeaux sont survenues sur le littoral français. Ces mortalités ont d'abord été observées dans le sud de la **Bretagne** près de Concarneau, en 1997, puis au nord de la Bretagne en 1998 et ont atteint les côtes de la **Normandie** et des îles anglo-normandes en 1999 (Fig. 21-A). Seules des **pustules blanches** présentes sur le muscle pédieux des animaux semblaient être le symptôme d'une maladie. Nicolas et collaborateurs ont révélé la présence de bactéries mobiles au sein de broyats de tissus contenant l'hémolymphe et de pustules prélevés sur des ormeaux juste morts issus de l'écloserie du Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral (SMEL). Les analyses

²⁶ Inoculation d'agents pathogènes directement dans l'eau dans laquelle est acclimaté l'hôte.

phénotypique, biochimique et phylogénétique ont permis d'identifier une souche appartenant au genre *Vibrio*, la **souche ORM4**, et de l'affilier à l'espèce *V. carchariae* (espèce junior de *V. harveyi* (Gauger et Gomez-Chiarri, 2002)). L'inoculation au laboratoire de la souche ORM4 entraîne des mortalités dès le 3^{ème} jour après injection et le 5^{ème} jour après balnéation (Fig. 21-B). Afin de compléter ces résultats, deux stocks d'ormeaux sains ont été placés, en 2000, dans deux stations, au nord et au sud du littoral breton. Les ormeaux ont souffert de mortalités estivales dans les deux stations et l'espèce *V. carchariae* a été de nouveau détectée dans les tissus échantillonnés, ce qui corrobore son implication dans ces mortalités. Cette étude a également permis d'appréhender l'importance de la **température** dans le déclenchement de cette vibriose puisque les auteurs soulignent l'arrêt des mortalités en dessous de 17°C.

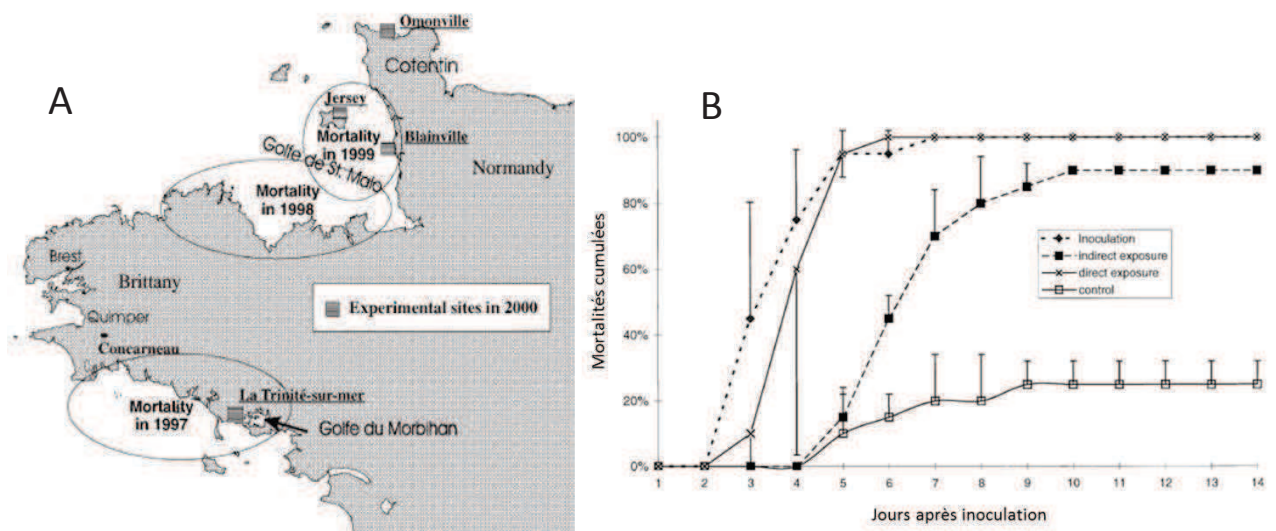


Figure 21 : Mortalités massives d'ormeaux européens observées en milieu naturel et reproduites au laboratoire (Nicolas *et al.*, 2002).

A : Mortalités d'ormeaux observées sur le littoral breton et normand entre 1997 et 1999 ;

B : Mortalités d'ormeaux inoculés au laboratoire avec une suspension de *V. harveyi*, inoculation : injection de 5.10^8 vibrions/animal, « direct exposure » : balnéation avec 10^5 vibrions/mL pendant 24h, « indirect exposure » : balnéation avec une eau contaminée, dans laquelle des ormeaux ont souffert de mortalités préalablement à l'expérience.

Les études réalisées ensuite par Marie-Agnès Travers, au LEMAR, dans le cadre de sa thèse, ont permis de spécifier les conditions de déclenchement de la vibriose de l'ormeau européen, d'y associer la physiologie de l'hôte et enfin d'appréhender les stratégies de virulence de la souche ORM4.

L'ensemble de ces résultats peut être illustré par une adaptation du schéma conceptuel des interactions hôte-parasite-environnement proposé par Snieszko (Snieszko, 1973) et seront exposés ci-après (Fig. 22).

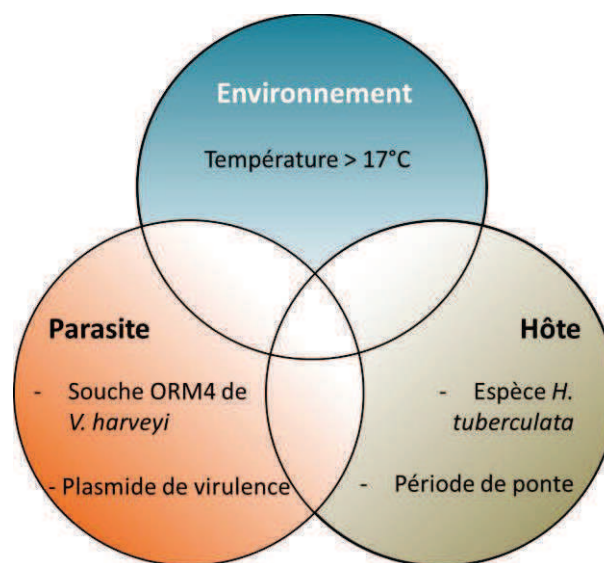


Figure 22 : Schéma conceptuel de l'interaction entre Ormeau européen – *V. harveyi* – Environnement (adapté de Snieszko, 1973 et Travers, 2008).

L'environnement

La **température seuil** de déclenchement de la vibriose chez l'ormeau européen est estimée entre 17°C et 18°C (Fig. 4). Aucun cas de mortalité due à *V. harveyi* ou aucune reproduction de la maladie en laboratoire n'ont pu être observés en-dessous de cette température. Afin de se prémunir de cette infection, l'écloserie *France Haliotis* de Plouguerneau (France) maintient, d'ailleurs, les géniteurs²⁷ à une température de 16°C (Huchette, communication personnelle) bien que la température optimale de l'espèce *H. tuberculata* soit estimée à 18°C (McBride *et al.*, 2001).

²⁷ Animaux élevés dans le but de produire une descendance rentable ou de transmettre des gènes d'intérêt.

La thermo-dépendance de cette maladie pourrait s'expliquer par l'influence de la température sur la croissance des vibrions et/ou sur leur virulence. Plusieurs questions pourraient découler de cette hypothèse : la phase d'initiation et/ou la poursuite du cycle infectieux sont-elles dépendantes de la température ? En d'autres termes, le vibron est-il capable d'adhérer et de pénétrer l'organisme-ormeau à 16°C ? Si oui, est-ce alors la quantité minimale et le ralentissement de sa croissance à 16°C qui empêche l'accomplissement des stratégies de virulence menant à la mort de l'ormeau ?

L'hôte

Travers et collaborateurs ont également établi que l'**état physiologique** des ormeaux est un facteur fondamental dans le déclenchement de la vibriose. En effet, seuls les ormeaux à **maturité sexuelle** semblent développer la maladie (Travers *et al.*, 2009a) alors que les juvéniles et les ormeaux non matures sexuellement n'y sont pas sensibles. La fenêtre de sensibilité des ormeaux se situe autour de leur période de ponte et les mortalités sont maximales juste après la ponte totale (Travers *et al.*, 2008d). Une **dépression du statut immunitaire** des ormeaux a été mise en évidence pendant la période de ponte et explique donc leur sensibilité à la vibriose durant cette période charnière de l'année (Travers *et al.*, 2008d). Cette dépression du statut immunitaire des ormeaux en période de maturité sexuelle témoigne d'un compromis physiologique entre le maintien d'une fonction immunitaire efficace et la reproduction. Or dans d'autres circonstances, les invertébrés marins peuvent également souffrir de dépression immunitaire, notamment en conditions contraignantes, telles que l'élévation brutale de la température, l'exposition à l'air ou la manipulation. Il serait donc intéressant de simuler ces contraintes et de constater leur effet sur la sensibilité à la vibriose chez l'ormeau afin de vérifier si le statut immunitaire ou le statut reproducteur de l'ormeau est le facteur primordial de déclenchement de la maladie.

Notons également que l'**âge** est un facteur influant la sensibilité à la vibriose chez l'ormeau européen, puisque le taux de mortalité est positivement corrélé à l'âge des ormeaux adultes (Travers *et al.*, 2009a).

Le parasite ou agent pathogène

Tel que cela a été expliqué précédemment, la **souche ORM4 de *V. harveyi*** est la souche responsable de la vibriose de l'ormeau européen (Nicolas *et al.*, 2002).

Des tests de sensibilité à d'autres souches ont été réalisés au laboratoire, notamment avec la souche LMG 7890, espèce pathogène du requin *Carcharhinus plumbeus*, et LMG 4044T, espèce pathogène de l'amphipode *Talorchestia sp* (Travers *et al.*, 2009b). Aucune de ces deux souches n'entraîne de mortalité chez l'ormeau européen après baignade dans une eau à 19°C, contenant 10^5 vibrions/mL, alors que la souche ORM4 induit généralement 80% de perte. En injection, les trois souches provoquent des mortalités à 19°C mais avec des LD50²⁸ à 2,5 jour après inoculation très variables, de $2,5 \cdot 10^2$ pour ORM4 à $8,9 \cdot 10^4$ et $1,6 \cdot 10^5$ respectivement pour LMG 4044T et LMG 7890. Aucun test d'injection n'a été réalisé à 16°C bien que cela pourrait permettre de mieux comprendre l'influence de la température sur le développement de la maladie et sur son importance dans la progression des phases du cycle infectieux.

Travers et collaborateurs ont également tenté d'appréhender les stratégies de virulence de la souche ORM4 de *V. harveyi* chez l'ormeau européen. Ils ont ainsi montré que cette souche était capable d'inhiber partiellement la voie de transduction de signal dépendante de la **MAPK p38** (Travers *et al.*, 2009b). La régulation des autres voies de signalisation par cette souche reste encore à élucider.

Enfin, il semble que la virulence de la souche ORM4 soit en lien avec la présence d'un ou deux **plasmides** potentiellement porteurs de gènes de virulence (Travers *et al.*, submitted). Aucun facteur de virulence propre à la souche ORM4 n'a pu être mis en évidence dans ces études.

²⁸ Dose d'une substance toxique ou de parasites qui provoque 50% de mortalité chez les sujets considérés.

L'interaction

La souche ORM4 de *V. harveyi* a été retrouvée dans différents tissus de l'ormeau, 24h après mise en contact et peut être aisément isolée à partir d'échantillons d'hémolymphe prélevés chez des individus infectés. Ainsi, l'observation microscopique de cette souche transformée afin d'exprimer une protéine fluorescente (« Green-Fluorescent Protein » ou GFP) a permis de montrer que la **branchie, le muscle et l'hémolymphe** sont des tissus cibles de cette bactérie chez l'ormeau (Travers *et al.*, 2008a) (Fig. 23). La quantification des bactéries dans l'hémolymphe des ormeaux au cours du temps révèle des concentrations bactériennes de l'ordre de 10^9 vibrions/mL en fin d'infection, caractéristiques des cas de **septicémie**, qui est probablement l'origine des mortalités (Travers *et al.*, 2008a). L'étude de la voie d'entrée et de la temporalité du cycle infectieux permettrait de mieux comprendre l'enchaînement des étapes de développement de la vibriose chez l'ormeau.

Les informations acquises sur la temporalité du cycle infectieux pourraient également permettre d'étudier la réponse physiologique des ormeaux en contact avec *V. harveyi* à chaque étape de l'infection.

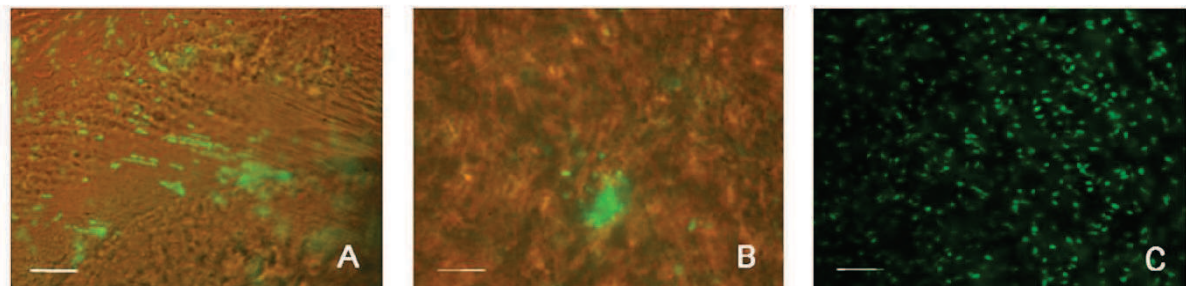


Figure 23 : Observations microscopiques de tissus d'ormeaux moribonds, infectés par la souche ORM4-GFP de *V. harveyi* après 48h de contact(Travers *et al.*, 2008a).

Les tissus ont été écrasés entre deux lamelles et visualisés au microscope à épifluorescence.

A : Insertion de bactéries dans les sillons des filaments branchiaux ;

B : Amas bactériens dans la muscle pédieux ;

C : Forte quantité de bactéries dans l'hémolymphe caractéristique d'un cas de septicémie.

Objectifs

Au regard de l'état des connaissances, les travaux développés au cours de cette thèse visaient à apporter des informations supplémentaires sur la réponse physiologique des ormeaux en conditions contraignantes (stress, vibriose), à mieux comprendre les stratégies de virulence et le cycle infectieux de *V. harveyi* et à intégrer la réponse transcriptomique et immunitaire de l'ormeau lors des étapes du cycle infectieux.

Ainsi, la partie récapitulant les résultats obtenus sera organisée en trois chapitres qui feront lien avec ces objectifs :

- le premier chapitre s'intéresse 1/ à l'étude de la réponse génomique des ormeaux face à la vibriose et, l'identification de marqueurs potentiels de cette réponse et de la résistance ou de la sensibilité à cette maladie, par le biais de l'utilisation des banques soustractives ; 2/ à l'étude de la réponse transcriptomique et immunitaire et de la sensibilité à la vibriose, chez des ormeaux soumis à des conditions contraignantes typiques du milieu naturel et des pratiques halioticoles, l'exposition à l'air et la manipulation.

- le second chapitre expose les résultats acquis sur la dynamique d'infection de l'agent pathogène *V. harveyi* chez l'ormeau, sur la mise en évidence des étapes dépendantes de la température et enfin présente succinctement les facteurs potentiels de la virulence de la souche pathogène de l'ormeau.

- le dernier chapitre intègre les résultats acquis dans les deux premiers chapitres afin de comprendre la réponse immunitaire des ormeaux lors des premières étapes du cycle infectieux et de découpler les paramètres température, maturité sexuelle et présence de bactéries pathogènes dans la réponse physiologique des ormeaux, à l'échelle moléculaire et cellulaire.

Enfin, ce manuscrit se termine par une brève conclusion générale et une présentation de quelques perspectives potentielles d'étude sur l'interaction entre l'ormeau européen et la bactérie pathogène *V. harveyi*.

Résultats et discussion

Premier chapitre :

Réponse de l'ormeau européen à la vibriose et aux conditions contraignantes, par approche transcriptomique et immunologique

A-Introduction

Des mortalités estivales d'ormeaux européens sont observées depuis la fin des années 1990 sur le littoral breton et normand (Nicolas *et al.*, 2002). Ces mortalités sont attribuées à l'espèce *Vibrio harveyi*, et semblent se déclencher exclusivement pendant la période de pleine maturité sexuelle lorsque la température dépasse 17°C (Travers *et al.*, 2009a). Cette période est caractérisée par une dépression de l'immunité des ormeaux, ce qui atteste l'influence de la physiologie de ces derniers sur le développement de la maladie (Travers *et al.*, 2008d).

Lorsque la maladie est reproduite au laboratoire, en conditions standardisées, elle entraîne jusqu'à 80% de perte sur les lots d'ormeaux mis en contact avec le vibriion pathogène. Ainsi seuls quelques individus semblent pouvoir survivre à la présence du pathogène. Se pose alors la question de savoir si ces survivants ont une particularité physiologique qui leur assure une résistance à la vibriose.

Peu de connaissances ont été acquises sur la physiologie des ormeaux européens et sur les voies métaboliques impliquées dans la survie à la vibriose. Une étude génomique globale a donc été envisagée afin de 1/ connaître les voies métaboliques potentiellement impactées par la vibriose chez l'ormeau européen, 2/ révéler les différences de profils d'expression de gènes entre animaux sensibles et animaux résistants à la vibriose, et 3/ mettre en évidence de nouvelles séquences de gènes non décrits chez cette espèce, potentiels marqueurs de cette interaction hôte-parasite et de la résistance à la vibriose.

A ces fins, des échantillons de muscle d'ormeaux survivants, sensibles et prélevés à l'état moribonds²⁹, et non mis en présence de *V. harveyi* (témoins) ont été utilisés pour construire des banques soustractives (SSH) (Fig. 24). Le principe de cette technique est d'identifier des séquences d'ADN spécifiques à un groupe d'organismes expérimentaux par rapport à un groupe de référence (Diatchenko *et al.*, 1996).

La construction de banques soustractives a été largement utilisée pour étudier la réponse de mollusques aquatiques à des maladies infectieuses, notamment chez des bivalves infestés par le protiste *Perkinsus marinus* (Tanguy *et al.*, 2004; Prado-Alvarez *et al.*, 2009), ou chez le gastéropode d'eau douce *Biomphalaria glabrata* mis en présence du parasite *Schistosoma mansoni* (Guillou *et al.*, 2007).

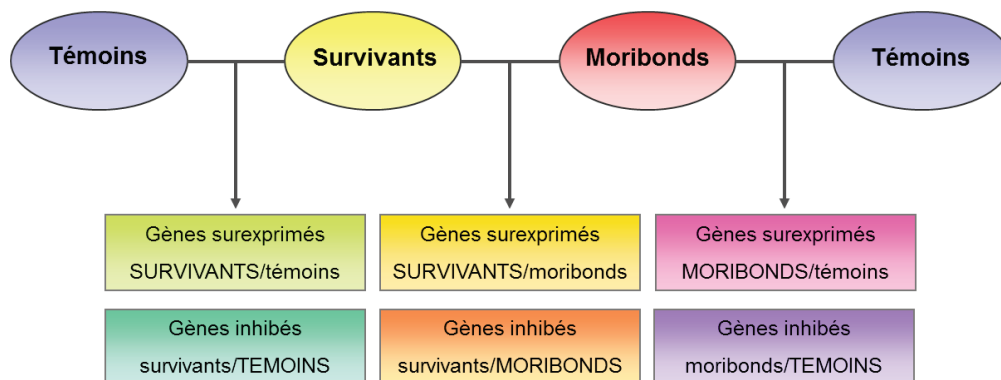


Figure 24 : Schéma des différentes banques soustractives réalisées chez *H. tuberculata*.

Les différentiels d'expression de gènes ont été révélés entre des ormeaux ayant survécu (résistants) à deux infections successives par la bactérie pathogène *V. harveyi*, des ormeaux sensibles (moribonds) après 7 jours de 2ème infection, et des ormeaux témoins qui n'ont jamais été mis en présence du pathogène.

La validation des profils d'expression de gènes a ensuite été réalisée par PCR en temps réel au cours de deux infections successives, chez des ormeaux survivants, sensibles et témoins.

Les résultats de cette étude sont exposés dans l'**article 1** présenté dans la seconde partie de ce chapitre.

²⁹ Animaux ayant perdu leur capacité de déplacement et de fixation au substrat mais encore vivants.

Par ailleurs, les transferts et les déplacements d'ormeaux prélevés dans le milieu naturel, au laboratoire ou en structures aquacoles engendrent des mortalités estimées entre 15 à 75% du stock (Huchette, communication personnelle ; observation personnelle) (Fig. 25). Or les principaux facteurs contraignants de ces transferts sont causés par l'exposition à l'air et la manipulation des animaux. L'origine de ces mortalités : faible tolérance physiologique à ces conditions contraignantes ou favorisation de maladies infectieuses restaient méconnues, d'autant qu'elles concernent des ormeaux à différents stades de maturité sexuelle ou acclimatés à différentes températures.

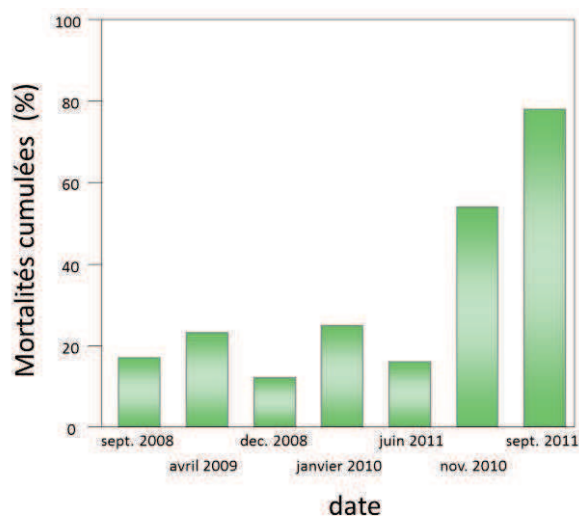


Figure 25 : Mortalités d'ormeaux observées dans les 10 jours suivant le transfert d'ormeaux au laboratoire.

Les dates inscrites sous le graphique correspondent aux dates de ces transferts.

Une étude d'expérimentation *in vivo* mimant ces conditions d'exposition à l'air et de manipulations successives couramment pratiquées lors des transferts d'ormeaux, couplées à des analyses transcriptomiques et immunologiques a été réalisée afin d'estimer la réponse des ormeaux à ces conditions. Dans un second temps, la sensibilité à la vibriose a été testée chez des animaux sexuellement immatures ou matures, placés à 16 ou 19°C.

Les résultats sont présentés dans la seconde partie de ce chapitre et font l'objet de **l'article 2** de ce manuscrit, accepté dans la revue Fish and Shellfish Immunology.

Les méthodologies utilisées dans ce chapitre et leur intérêt dans les études hôte-parasites sont abordées dans l'annexe 1 de ce manuscrit.

B- Résultats

1. Article 1 : Profils d'expression de gènes chez l'ormeau européen soumis à la vibriose

Journal of Invertebrate Pathology 105 (2010) 289–297



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

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



Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*

Marie-Agnès Travers^{a,b,1,2}, Anne-Leila Meistertzheim^{b,1,3}, Marion Cardinaud^b, Carolyn S. Friedman^c, Sylvain Huchette^a, Dario Moraga^b, Christine Paillard^{b,*}

^aFrance Haliotis, Kerazan, Lilia, 29880 Plouguerneau, France

^bLaboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

^cSchool of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington, Box 355020, Seattle, WA 98195, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2010

Accepted 3 August 2010

Available online 6 August 2010

Keywords:

Haliotis tuberculata

Vibrio harveyi

Bacterial challenge

Reproduction

Gene expression

ABSTRACT

Since 1998, episodic mass mortality of the abalone *Haliotis tuberculata* has been observed along the northern Brittany coast of France caused by a complex interaction among the host, pathogen and environmental factors. In the present study, abalone were submitted to two successive infections with the pathogen *Vibrio harveyi* under controlled conditions. During the first challenge, infection by *V. harveyi* resulted in 64% mortality of mature abalone. After a second infection of those surviving the first challenge, only 44% mortality was observed. Physiological variability in the host response appears to be a major determinant in susceptibility to *V. harveyi*. In order to isolate differentially expressed genes in *H. tuberculata* challenged with this bacterium, suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA libraries were constructed from muscle of moribund abalone (susceptibles), surviving individuals (apparently resistant to the bacterium) and control (unexposed) animals. Of the 1152 clones sequenced, 218 different partial cDNA sequences were obtained and represented 69 known genes. Of these, 65 were identified for the first time in *H. tuberculata*. Using real-time PCR, a time-course study was conducted on 19 of the genes identified by SSH. A majority of differentially expressed transcripts were down-regulated in susceptible individuals as compared to their resistant counterparts. Bacterial challenge of abalone resulted in the up-regulation of three transcripts (encoding ferritin, heat shock protein HSP84 and fatty acid binding protein FABP) in those that survived exposure to *V. harveyi*. This study has identified potential candidates for further investigation into the functional basis of resistance and susceptibility to summer vibriosis outbreaks in abalone.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

During the past decade, disease outbreaks in both farmed and wild populations of European abalone, *Haliotis tuberculata*, have been associated with emerging protistan (Azevedo et al., 2006a; Balseiro et al., 2006) and bacterial parasites (Azevedo et al., 2006b; Balseiro et al., 2006; Nicolas et al., 2002). Declines in European stocks of abalone have coincided with emergence of these pathogens (Huchette and Clavier, 2004). During mass mortality episodes in France, *Vibrio carchariae* strains (junior synonym of *Vibrio harveyi* (Gauger and Gomez-Chiarri, 2002)) were isolated from farmed pop-

ulations and wild *H. tuberculata* (Nicolas et al., 2002). In moribund abalone, bacterial infection with *V. harveyi* is characterized by the presence of multifocal bacterial colonies in the pedal muscle and dense concentrations of the bacterium (up to 10⁹ bacteria/ml) in the hemolymph (Travers et al., 2008a). *V. harveyi* was already known to cause shellfish mortalities (Austin and Zhang, 2006; Goarant et al., 2000; Liu et al., 1996; Nishimori et al., 1998) and gastroenteritis in fish (Lee et al., 2002), but little is known about the host response to *V. harveyi* infection at the molecular level.

Mass mortality of the European abalone typically occurs at the end of the summer when abalone undergo maturation and spawning, and seawater temperatures are elevated (Nicolas et al., 2002; Travers et al., 2009a,b). In both field surveys and laboratory experiments, when seawater temperature exceeds 17 °C, bacteria-induced losses of reproductively mature *H. tuberculata* may reach as high as 80% within a few days (Travers et al., 2009a). Immature abalone are resistant to natural infection by *V. harveyi* (Travers et al., 2009a). Susceptibility to *V. harveyi* was associated with depression of the abalone immune response during the spawning

* Corresponding author. Fax: +33 2 98 49 86 45.

E-mail address: christine.paillard@univ-brest.fr (C. Paillard).

¹ MA Travers and AL Meistertzheim contributed equally to this work.

² Present address: FRE 3206 CNRS/MNHN USM504 CP 52 – 57, rue Cuvier 75231 Paris Cédex 05, France.

³ Present address: UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cédex, France.

period (Travers et al., 2008b). Thus, host physiological state plays a key role in determining its susceptibility or resistance to this serious bacterial pathogen.

Global genomic approaches have been used successfully to characterize the molecular basis of susceptibility to pathogens in, for example, species of oyster (Gueguen et al., 2003; Tanguy et al., 2004), clam (Gestal et al., 2007; Kang et al., 2006; Prado-Alvarez et al., 2009), and shrimp (Somboonwivat et al., 2006). These studies revealed the presence of previously undescribed genes in these organisms and provided new insights into the molecular basis of host–pathogen interactions.

To understand molecular patho-physiological mechanisms underlying bacterial infection, surviving and moribund abalone transcripts, we compared abalone subjected to one or two successive *V. harveyi* infection challenges to unexposed control abalone using suppressive subtractive hybridization (SSH). Differential gene expression was further validated on individuals using quantitative, real-time PCR.

2. Experimental procedures

2.1. Acclimation

Small, ripe, adult abalone, *H. tuberculata*, ($n = 240$, 32 ± 2 mm, 2 years old) were transferred from the local hatchery France Haliotis (Plouguerneau, France) to the LEMAR laboratory (University of Western Brittany) in August 2007 (seawater temperature 15.8 °C). Animals were acclimated in the laboratory for 3 weeks prior to initiation of the experiments. During this period, abalone were held in 110 L tanks that received 0.5 μm filtered, flow-through, aerated seawater. Animals were acclimated to 19 °C by progressive daily increases in water temperature of 1.5 °C every 2 days. Abalone were fed *ad libitum* with a marine macroalgal diet of *Palmaria palmata*. Temperature was then maintained at 19 °C until the end of the experiment.

2.2. Bacterial strains

The virulent *V. harveyi* strain (ORM4), previously isolated in 2002 from infected *H. tuberculata* in Normandy (France) (Nicolas

et al., 2002), was used in the challenge experiments. Bacterial cells were grown in Luria-Bertani broth complemented with salt (10 g/l, LBS) at 28 °C for 18 h, washed twice in filtered and sterile seawater (FSSW) before being adjusted to 10^6 CFU ml^{-1} in FSSW by OD measurement.

2.3. Bacterial challenge

For each bacterial challenge, 12 groups of 20 abalone each were maintained for 2 weeks without feeding in 5 L tanks under experimental conditions previously reported (Fig. 1). Throughout the experiment, seawater was changed daily. Six of the 12 groups were exposed for 24 h to a bath of 10^6 CFU ml^{-1} *V. harveyi* (final concentration) in seawater on August 1, 2007. The abalone were held at 19 °C for 2 weeks to select surviving animals, which were then fed for 2 days and maintained as above for 13 days. Subsequently, survivors of the single challenge were exposed, as above, to *V. harveyi* (successive infection groups), on August 28th 2007. In parallel with this second infection, three other groups of abalone (maintained under the same conditions) were infected once (single infection groups) and three groups of uninfected abalone (controls) were sham-exposed to seawater and kept in separate tanks. During all the procedure, seawater was changed daily and temperature was maintained at 19 °C. During each trial, dead abalone were counted and removed twice daily. Representative abalone from each group (controls, survivors and moribund animals) were examined for *Vibrio* infection by culture of hemolymph aspirates as described by Travers et al. (2009a).

2.4. Sampling

In order to compare the physiology of susceptible and resistant animals we chose to compare moribund (those unable to attach strongly to tank walls but still responded to tactile stimulation) to surviving (resistant) animals. The use of moribund animals was necessary as one cannot assess the outcome of bacterial challenge without a predictive marker, a goal of this study. All individuals collected (moribunds, surviving and control individuals) were rapidly fixed whole in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Beginning at the onset of mortality, each tank was examined every 12 h

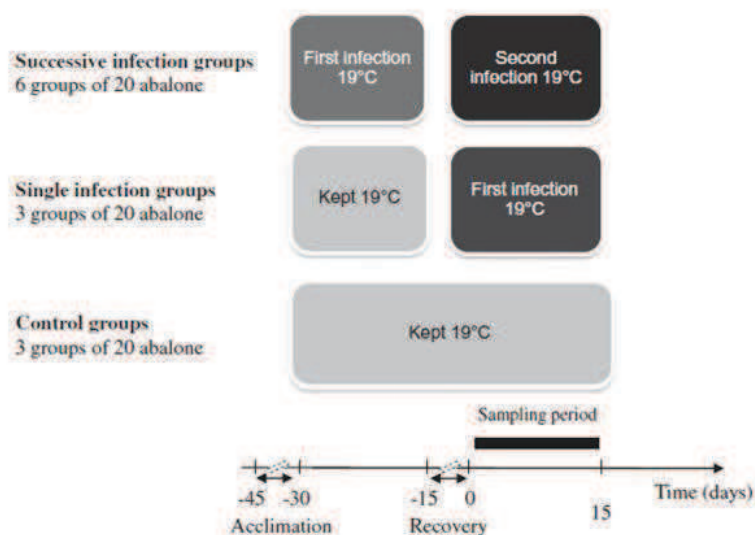


Fig. 1. *Vibrio harveyi* infection procedure for the 12 groups of *H. tuberculata* ($n = 20$ abalone each); control groups are composed of non-infected animals kept at 19 °C. Single infection groups correspond to the three experimental units that were singly infected with *V. harveyi*, and successive infection groups correspond to the six groups that were infected twice. A timeline was added for clarity.

for moribund individuals (susceptible to bacterial infection). Moribund in lieu of dead animals were collected to obtain the best RNA quality. Three to four moribund individuals were sampled per group on days 5, 6, 7, 8 and 12 post-infection in the first exposure trial (single infection groups) and on days 7, 8, 10 and 15 post-infection in those that received a second bacterial exposure (successive infection groups). In addition to sampling moribund animals, four other individuals from the first trial (single infection groups) were randomly sampled 12 h, 2 days, 5 days and 12 days post-infection. Similarly, individuals in the second trial (successive infection groups) were randomly sampled 10 and 15 days after the onset of infection. Control abalone were collected at 12 h, 2, 5, 7, 8, 10, 12 and 15 days post-sham infection (Fig. 1).

2.5. RNA extraction

In order to select the optimal RNA extraction method, different protocols were previously tested. The quality of RNA extracted was assessed by electrophoresis migration on 1% agarose gel (data not shown). The best extraction method chosen is the following procedure. Lateral and basal mucus cells were excised from the pedal musculature and discarded. The remaining central, pedal musculature was minced with a scalpel blade and suspended in TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) at a ratio of 1 mL Trizol to 50 mg of tissue. Suspended muscle was then homogenized (using a tissue tearer, Ultrathurax) on ice. Subsequently, total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. For SSH experiments, polyadenylated RNA was isolated using the PolyATtract® mRNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. RNAs were resuspended in RNase-free water and their quantity was assessed by spectrophotometry (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher scientific, USA).

2.6. Suppression subtractive hybridization

Suppression subtractive hybridization libraries were constructed by subtracting mRNA from muscle of moribund *H. tuberculata* (day 7), survivors of two infections (day 15) and control abalone (day 15). Two micrograms of a pool of mRNA from 10 individuals in each group were used as the template for SSH following the PCR-select cDNA subtraction kit procedure (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Hybridization and subtraction steps were carried out in both directions. Four libraries were produced: survivors vs. controls (forward and reverse), and moribunds vs. controls (forward and reverse). PCR products were then purified and cloned into pGEM-T vector (Promega). Two hundred eighty-eight white colonies per library were grown in Luria-Bertani medium (with 100 mg L⁻¹ ampicillin). A total of 1152 clones were single-pass sequenced at the "Ouest Genopole Plateforme" (Roscoff, France, <http://www.sb-roscoff.fr/SG/>) on a ABI prism 3100 GA sequencer (Applied Biosystem), using the BigDye Terminator V3.3 (Applied Biosystem) and T7 primer on the pGEM-T vector following the manufacturer's instructions. The initial phase of denaturation (2 min with 96 °C) was followed by 40 cycles of 96 °C for 30 s, 50 °C for 30 s and 60 °C for 4 min. All sequences were subjected to a homology search through the BlastX program available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the EST sequences were then submitted to its dbEST and GenBank datBbases databases (see supplementary Tables S1–S4). Identified genes were classified by function using Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).

2.7. Real-time PCR analyses

Quantitative, real-time PCR (qPCR) was used to analyse the expression profiles of 19 selected genes involved in protein

synthesis, cellular respiration, general and energetic metabolism, homeostasis, neurotransmission, muscular activity, endocytosis, cytoskeleton organization, and stress response. Total RNA was extracted from the muscle of three animals per experimental condition at different time points over the course of the bacterial challenge. Reverse transcription was performed with 1 µg of RNA from each sample using hexamer primers and RevertAid™ kit (Fermentas, International Inc., Burlington, Canada). qPCR analysis was performed with 5 µL cDNA (1/100 dilution) in a total volume of 10 µL using a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The concentrations of the reaction components were as follows: 1X Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (AB gene, UK) and 70 nM of each primer. Oligonucleotide primer sequences used to amplify specific gene products and designed using Primer express software (Applied Biosystems, Foster City, CA) are shown in Table 1. Reactions were initiated with the activation of Thermo-Start® DNA polymerase at 95 °C for 15 min followed by amplification of the target cDNA (45 cycles of: denaturation at 95 °C for 30 s, annealing and extension at 60 °C for 1 min). Melt curve profiles (95 to 70 °C decreasing by 0.5 °C every 10 s) were assayed to ensure a single product. Each run included a positive cDNA control (one control sample at the beginning of the present experiment analyzed in each amplification plate) and blank controls (water) for each primer pair. After separation of amplified products by standard agarose electrophoresis, observed bands were cut directly from the agarose gel and DNA extracted using a Quiax II Gel extraction kit (Promega). The sequence reaction was performed on extracted PCR products with the use of the sequencing reagent BigDye V3.1 (Applied Biosystem) and the forward primer previously used for the qPCR assay. The initial phase of denaturation (2 min with 96 °C) was followed by 40 cycles of 96 °C for 30 s, 50 °C for 30 s and 60 °C for 4 min. The DNA sequences were determined by an automated sequencer (ABI 3130).

To calculate gene expression levels, the threshold value (C_t) was determined for each target as the number of cycles at which the fluorescence rose appreciably above the background fluorescence. PCR efficiency (E) was calculated for each primer pair by determining the slope of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA from two different experimental samples (moribund and survivor), using the method described by Yuan (Yuan et al., 2006). The individual qPCR efficiencies (E) for target or reference genes were calculated according to: $E = 10^{-1/\text{slope}}$. Results are presented here as changes in relative expression normalized to the reference gene (ribosomal 18S) as previously described (Meisterzheim et al., 2007), using the method described by Pfaffl (2001) and determined using the equation:

$$\text{Relative expression} = \frac{[(E_{\text{target}})^{C_{t\text{target}}(\text{control-sample})}]}{[(E_{\text{ref}})^{C_{t\text{ref}}(\text{control-sample})}]}$$

where E_{target} = amplification efficiency of the target or gene of interest; E_{ref} = amplification efficiency of the reference (ribosomal 18S); and C_t = cycle threshold.

2.8. Statistical analyses

Cumulative mortality curves were compared with a Kaplan–Meier survival analysis using the MEDCALCs (version 9.6.4.0) statistical software. Variations in gene expression between control, moribund and surviving abalone were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by LSD test using STATISTICA 8.0 software (Statsoft). These statistical analyses were performed using qPCR expression values obtained from three separate animals per treatment collected on each sampling date. Normality and homoscedasticity of values were verified. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. The graphs (Fig. 4

Table 1
Combinations of forward and reverse primers used in real-time PCR expression analysis.

Gene name	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
Calponine 2	CCTGCCITCAGCTGTCTTCA	TTGGCACAGAGGCTCAGAGA
Clathrine	CACCTCGCTCGTCAACTTCTT	CTGGTAGTCTCTCTCTCAATGA
Cytochrome c oxidase subunit I	TCTATGGGAGCGGTTTTTGC	TTTTGTTCACCGGGCATGA
Cytochrome c oxidase subunit II	CGTCGGTCAACCTCAAGCA	TTAAAGCAACCGCAATCAAT
Cytochrome c oxidase subunit III	TTGGAAACCTCTTTTTATCACCTT	TTCCAAGTTCCTCTCTCAA
EF2	ATGGAGTTTGTGGGATGAGAA	TCCGGCTGGAGAGTCACAT
FABP	TCCGATTACGAAAGGAGAGA	CCACCATTTGTCCCATCA
Ferritin	CGTGACGACTGGCATTCTC	GGACCACATCAACACCTGAA
Glutamine synthetase	GCGACACCTGCCGAGAAGT	AGTTATGAAGAAGCCATCGAGAGA
HSP 84	GATTCCGCTATCGGTTTGT	TGTGGCGATGTTATTTGGGA
NADH dehydrogenase subunit 2	CGGTTTCGTTTTTGGTGT	ATCTCGGCTCTGCTAATTGCA
Ribosomal protein 18S	AGAAACGGCTACCACATCCAA	TTCTCACTACCTCTCGTATGG
Ribosomal protein L23	TTTGCCCGCTATTGCA	ATTTGCCCTTTAGTTACTIAGGA
Ribosomal protein L5	TCAATGCCCGCATCAACA	GAGACGAAGATGGCAAAACA
Ribosomal protein PO	ACCGATGATGACCTGGCATT	CAGCCAGGAGCCTCTTGAAT
Reptin	ICTGATCTTGAGGATCTGTTTATTTCT	CATCGACTGCTCGACAGACT
Sar1	TCCAGAGCGGACCTTCCAT	TACCTTGTCCGTTCAACACACT
Staufen	AGTTGTTGCGCTGCTAGT	GGGCTGTGCTTATTCCTCAAG
Taurine Transporter	GGGCTTGCGTTCATGCT	AAACCCCTCTACGCCAACAA
Troponin T	AGACAGGGCAAGAGGCAAA	GGGTGAGAGAGGGTATGAA

and supplementary Fig. S1) present the means of ratio per condition \pm standard error.

3. Results

3.1. Evidence of abalone resistance to successive infections of *V. harveyi*

Naive abalone exposed to a single infection with *V. harveyi*, (single and first of the successive infection groups) reached a mean cumulative mortality of 64% (SE 3%) within 8 days. Significantly fewer abalone died when exposed to the bacterium twice in two successive challenge trials (successive infection group, 44% SE 1%) during this same period (Fig. 2, $P < 0.05$). *V. harveyi* was consistently found in the hemolymph of moribund animals examined, but was never observed in survivors or in controls.

3.2. Suppression subtractive hybridization

Suppression subtractive hybridization libraries constructed with pooled mRNA from muscle of moribund *H. tuberculata* (day 7), survivors of two infections (day 15) and control abalone (day 15) are illustrated in Fig. 3. Using the BLASTX program, 218 different sequences were detected, of which 152 sequences (about 70%)

remain unidentified. A redundancy of more than 15% was obtained in each library. Transcripts with high homology to known genes clustered into the following 12 functional categories: angiogenesis, cell cycle regulation and proliferation, cell respiration, cytoskeleton organization, endocytosis, general (including lipid and carbohydrate metabolism) and energetic metabolism, homeostasis, muscular activity, neurotransmission, protein synthesis (including ribosomal proteins and proteins implicated in replication, repair, transcription and translation regulation) and stress response (Fig. 3 and supplementary Tables S1–S4). Genes coding for proteins involved in general and energetic metabolism were up-regulated in survivors and down-regulated in moribund compared to control abalone ($P < 0.05$). Thus, the 11 functional groups defined by SSH appeared as down-regulated genes in susceptible (moribund) animals. Interestingly, genes involved indirectly and not directly in the immune system, such as ferritin and glutamine synthetase, were identified in the samples used to construct the four libraries.

3.3. Gene expression patterns from different functional categories during *Vibrio* challenge

Using reverse transcriptase qPCR, differential expression of mRNA transcripts was observed over the study period between susceptible and surviving animals exposed to one or two *V. harveyi* infections compared to non-infected controls. Fig. 4 and Fig. S1

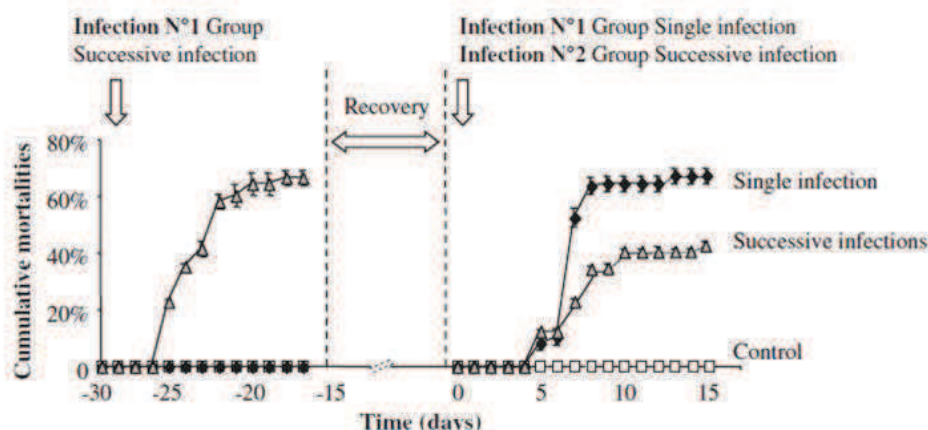


Fig. 2. Cumulative mortalities associated with exposure to 10^6 *V. harveyi*/ml for a 24 h exposure period. Bars represent standard error. Black diamonds correspond to abalone infected twice; grey triangles to abalone infected once, and white squares to controls without bacterial exposure.

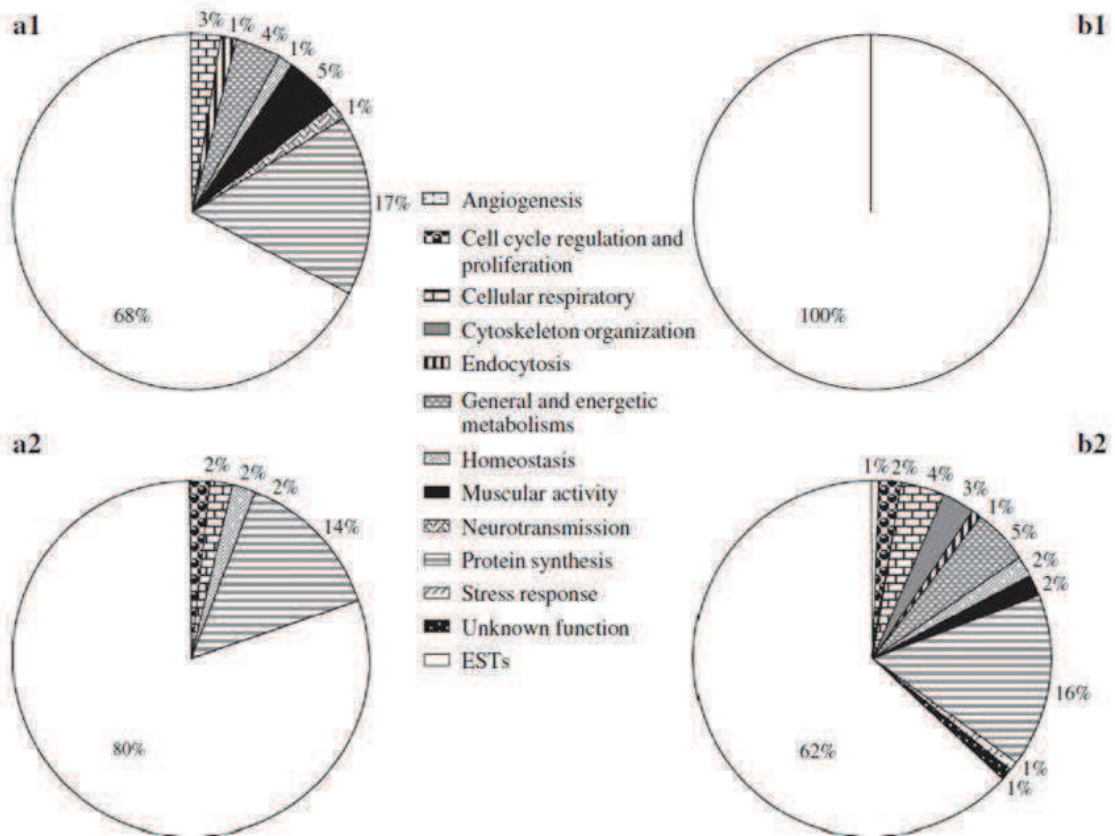


Fig. 3. Functional classification of the sequences identified in SSH libraries. SSH were made from pooled mRNA from muscle of moribund (susceptible) *H. tuberculata* after 7 days and survivors after 15 days of the second infection, and controls collected at the end of the procedure. Genes were clustered into 13 categories according to their putative biological function. a1 and a2: up and down-regulated genes, respectively, in moribund individuals relative to controls; b1 and b2 up- and down-regulated genes, respectively, in surviving individuals relative to controls.

illustrate the expression profiles of 19 genes assigned to the following nine different functional categories: (a) protein synthesis and regulation: transcripts encoding ribosomal proteins L5 (rpl5), L23 (rpl23) and P0 (rpP0), elongation factor 2 (EF2), repton and staufer proteins; (b) cellular respiratory: transcripts encoding cytochrome c oxidase (COX) subunits I, II and III, and NADH dehydrogenase (EC 1.6.5.3) subunit 2 (NADH DH2); (c) general and energetic metabolism: transcripts encoding glutamine synthetase (GLS, EC 1.4.1.13) and a fatty acid binding protein (FABP); (d) homeostasis: transcript encoding ferritin; (e) neurotransmission: transcript encoding taurine transporter; (f) muscular activity: transcript encoding calponin 2; (g) endocytosis: transcripts encoding Secretion-Associated and Ras-Related Protein 1 (SAR1) and clathrin; (h) cytoskeleton organization: transcript encoding troponin T; (i) stress response: transcript encoding heat shock protein (HSP) 84.

All selected genes encoding proteins involved in muscular activity (calponin 2 and troponin T) and endocytosis (clathrin) were significantly down-regulated in moribund individuals ($P < 0.05$, Fig. 4A–C). Expression of genes involved in protein synthesis (staufer, rpl5) was significantly down-regulated in susceptible individuals beginning on day 6 of the first infection ($P < 0.05$; Fig. 4D–E), except for repton, which was up-regulated during the first and second infection in moribund abalone (Fig. 4F). Expression of the gene encoding FABP at the end of second infection was elevated in survivors relative to control and susceptible individuals ($P < 0.05$; Fig. 4G). Transcripts of glutamine synthetase (GLS) were also down-regulated in moribund abalone beginning on day 7 of

both infection trials ($P < 0.05$; Fig. 4H). Patterns of cellular respiratory gene transcription differed among groups. The genes encoding COX III was up-regulated at the end of first and second infections relative to surviving abalone to controls (Fig. 4I). The gene encoding NADH DH subunit 2 was up-regulated only at the beginning of the second infection in moribunds relative to control ($P < 0.05$; Fig. 4J). Expression of the transcripts of ferritin and HSP84 associated with homeostasis and stress response, respectively, increased in survivors and strongly decreased in moribunds at the end of the first and second infections compared to control abalone ($P < 0.05$; Fig. 4K,L). Transcripts of ribosomal protein rp P0, elongation factor EF2, and taurine transporter were also down-regulated in moribund abalone beginning on day 7 of both infection trials (Fig. S1 A–D). No significant differential expression was observed for genes encoding ribosomal protein rpl23, SAR 1, COX I and II (Fig. S1 B,E–G).

4. Discussion

This is the first study to illustrate natural resistance of abalone after successive exposures to the pathogen *V. harveyi*. One must define what is implied when suggesting animals are “resistant” to an infectious agent. Here we used the terminology proposed by Coustau and Theron (2004) who defined that resistance to pathogens as ‘the inherent ability of organisms to prevent establishment or development of a given species or strain of compatible pathogen, by opposition to susceptible organisms from the

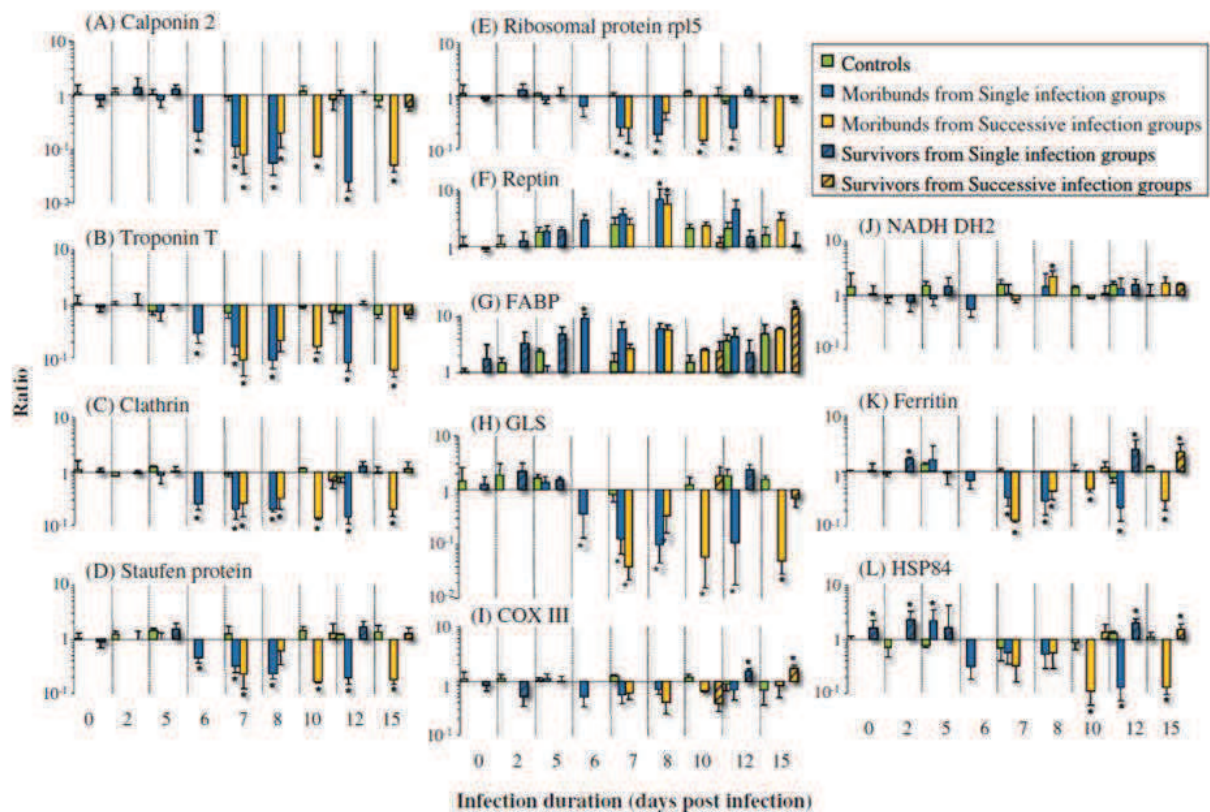


Fig. 4. Temporal expression patterns during successive *V. harveyi* infections of some representative genes identified in SSH libraries. Relative expressions were normalized with 18S RNA and presented as a ratio as previously described (Pfaffl, 2001). Bars represent the mean of three biological replicates per condition and the error bars correspond to SE. Differences between these groups were assessed by ANOVA and LSD test. * $P < 0.05$ between surviving or moribund and control animals.

same species'. Resistance is a relative term and indicates that a group or groups of individuals are significantly better able to prevent the establishment/development of an infectious agent relative to another group. Thus, although some individuals in a population might succumb to an infection, overall a population may be more resistant to a given pathogen than another population in which many more individuals become infected and die.

Resistance can result from an enhance induction of a defence response (behavioural, chemical, immune, structural) (Coustau and Theron, 2004). In oysters, resistance mechanisms can rely on the expression of different enzyme isoforms (for instance phenoloxidase (Bezemer et al., 2006)), or on a heightened innate immune response corresponding to a regulation of resource allocations (Huvel et al., 2004). On the other hand, an acquired immune response can also confer ability to prevent pathogen infection. Invertebrate immunity is thought to involve an innate system. Recent molecular evidence of an invertebrate immune memory has been documented in arthropod species, including marine species such as penaeid shrimp (Dong et al., 2006; Rowley and Powell, 2007; Watson et al., 2005), and in a freshwater molluscan species, *Biomphalaria glabrata* (Zhang et al., 2008). Despite recent data related to immune memory, we chose to examine all transcripts to fully characterize differences in host physiology in susceptible as compared to resistant individuals.

Genomic expression patterns of resistant and susceptible abalone during infection are still unknown, despite the increase in abalone mortality events due to vibriosis. A single study to date has focused on characterising regulation of immune-related abalone genes in haemocytes during a bacterial challenge and has re-

vealed new immune indicators (Wang et al., 2008). Because of the economic interest of abalone species combined with recent losses due to bacterial disease, a large-scale screening of abalone genes regulated particularly by vibriosis is necessary. In this paper, we characterized the molecular response of *H. tuberculata* during two successive bacterial challenges with the strain of *V. harveyi* that is responsible for episodic mortality of reproductively mature abalone during late summer in France (Nicolas et al., 2002). Using SSH methods, we obtained 218 different partial sequences of cDNA. Of the 218 cDNAs, 66 genes were recognized upon BLAST searches in NCBI databases. Other than four genes coding for actin (Farcy et al., 2007), cytochrome *b* (AY940978, GenBank databases), cytochrome oxidase subunit I (Okusu et al., 2003) and HSP84 (Farcy et al., 2007), 65 genes were identified for the first time in *H. tuberculata*. SSH was previously used to assess the response of aquatic molluscs to disease challenges (e.g. bivalves infected by protistan parasites *Perkinsus marinus* (Prado-Alvarez et al., 2009; Tanguy et al., 2004) or by quahog parasite unknown (QPX (Perrigault et al., 2009); a freshwater mollusc infected by *Schistosoma mansoni* (Guillou et al., 2007)) and to compare resistant organisms to their susceptible counterparts (Green et al., 2009; Nowak et al., 2004). The large number of ESTs identified in this study lacking matches in GenBank may be explained by the paucity of EST datasets for mollusc species, particularly in abalones.

Our study characterized changes in abalone *H. tuberculata* physiology when challenged with *V. harveyi*. Several physiological pathways are regulated by bacterial challenge and among the different genes characterized, 33 genes appeared to encode elements of the transcriptional and translational machinery including transcription

factors, ribosomal proteins and elongation factors. Among them, 11 genes were previously identified in molluscs responding to pathogenic infections (Gestal et al., 2007; Kang et al., 2006; Tanguy et al., 2004). Thus, their gene products appear not to be specific but may be important for metabolic adjustments during pathogen challenges. Infection by *V. harveyi* produces multi-focal aggregations of the bacterium in the foot muscle (Handlinger et al., 2005). Thus, the observed down-regulation of genes involved in muscular activity (actin folding (Noda et al., 1992) muscular contraction (Funabara, 2004; Goldberg and Lehman, 1978; Inoue et al., 1996) and cytoskeleton structure (Somboonwiwat et al., 2006)) may be related to the presence of these pedal lesions in moribund animals.

In response to a bacterial challenge, we hypothesized that genes involved in protection against cellular stress and inflammation would be up-regulated. However, only three genes coding for anti-stress proteins (e.g. heat shock proteins) were differentially expressed. HSPs are molecular chaperones that play an essential role in maintaining protein homeostasis during exposure to proteotoxic stressors (Lindquist, 1986). They function by interacting with stress-denatured proteins and preventing their aggregation and/or degradation (Parsek and Lindquist, 1993). In the case of infectious stress, HSPs aid in the removal of damaged cells (Schlesinger, 1990) and HSP90s are critical regulators of inflammation (Arthur et al., 2007). In the present study the HSP84 isoform was rapidly slightly up-regulated in resistant individuals at the beginning and the end of the successive infections. Up-regulation of the gene was also observed at day 5 in susceptible individuals followed by a strong down-regulation in the susceptible abalone after day 6. Induction of HSPs was previously observed in *Mytilus galloprovincialis* infected with *V. alginolyticus* (Tiscar and Mosca, 2004) or in abalone infected with *V. anguillarum* (Cheng et al., 2007). The up-regulation of this molecular chaperone in infected *H. tuberculata* may provide a clue to molecular mechanisms associated with resistance in our more *V. harveyi*-resistant abalone. However, that the induction of anti-stress proteins was only observed in the first days in susceptible and in the last days of infection in resistant individuals suggests that further assessment of the role of HSPs in disease resistance is warranted.

The cellular stress response has an energetic cost, which is reflected in the differential expression of several genes associated with general and energetic metabolism. A similar response was demonstrated in the Pacific oyster *C. gigas* subjected to biotic or abiotic stressors (hydrocarbon, herbicides, parasite infection, hypoxia or thermal challenge) (Boutet et al., 2004; David et al., 2005; Meistertzheim et al., 2007; Tanguy et al., 2005). We observed induction of FABP 2 weeks after the second infection in resistant individuals and only in moribund animals during the first infection trial. FABP is a cytosolic protein involved in the uptake, transport and compartmentalization of fatty acids (Dhar et al., 2003) and may be stimulated under a variety of circumstances in which lipid is mobilized to provide the metabolic fuel required. Concurrent with FABP, the GLS gene was up-regulated only in resistant abalone. This pattern suggests a close link between energy and resistance of abalone to an infection by *V. harveyi* as previously described in *C. gigas* during summer mortality events (Samain and McCombie, 2007). However, modification of the energetic balance could also be caused by gametogenesis. Before the spawning, an immune-suppression was observed in *H. tuberculata* associated with increased susceptibility of abalone to *V. harveyi* (Travers et al., 2008b). Resistant individuals appear to regulate their energy metabolism differently than do susceptible individuals. Collectively, our results suggest an interaction between energy used for reproduction and resistance in the abalone response to *V. harveyi* infections.

We also hypothesized that genes involved in immune function would be up-regulated in response to bacterial infection. However,

we were not able to identify many known genes involved in immune regulation, although an upregulation of ferritin mRNA (up to 2.5× in resistant animals) was revealed by our analysis. Ferritin is a key protein of iron metabolism that can sequester large amounts of iron leading to the dual roles of detoxification and storage. Ferritin expression can be regulated at the post-transcriptional level, but is also strongly regulated at a transcriptional level during vertebrate inflammation (Recalcati et al., 2008). In echinoderms, Beck and coworkers suggested that ferritin is an acute phase protein and that iron sequestration may be a component of the invertebrate immune response (Beck et al., 2002) linked to the production of reactive oxygen species (ROS) (Beck et al., 2002; Nowak et al., 2004). During an infection, host cells regulate the availability of iron (Doherty, 2007), which is essential for proliferation of *Vibrio* spp. (Tolmasky and Crosa, 1991; Wright et al., 1981; Wyckoff et al., 2007). Some pathogens are able to obtain iron sequestered in ferritin molecules (Ratledge, 2007) particularly by siderophore synthesis as observed in *V. anguillarum*. Up-regulation of ferritin transcripts during the first days after the second infection in animals that survived to the first infection could indicate an attempt of the host to sequester iron and to limit the proliferation of *V. harveyi*. This process appeared to be inefficient for susceptible abalone which presented a significant down-regulation after the first date of mortality. Over the long-term, induction of ferritin observed in the resistant abalone may allow iron retention and control of ROS production. Similarly, Maiti et al. (2010) revealed recently the protective role of a recombinant ferritin in shrimp *V. harveyi* infection.

Invertebrate immunity relies on both cellular and humoral responses. Phagocytosis is the central mechanism of cellular immunity. Phagocytosis is one of the best indicators of immune competence of invertebrate and correlations between phagocytosis capacity and disease resistance has been previously reported (for review, Hooper et al., 2007). In our experiments, the gene coding for clathrin, a protein implicated in bacterial phagocytosis (Pauly and Drubin, 2007) was down-regulated in susceptible abalone, suggesting a potential phagocytosis deficiency in those animals.

In addition, *V. harveyi* is able to evade abalone hemocytes either by an active inhibition or by an absence of bacterial recognition as demonstrated by *in vitro* experiments (Travers et al., 2009b). As no strong induction or inhibition of immune components was revealed, it is tempting to conclude that the resistance here described is not related to known immune function, but rather on a metabolic regulation. To test this hypothesis, research designed to characterize the progression of host-parasite interactions throughout the course of infection (adherence, host-penetration, replication, etc.) in both resistant and susceptible hosts and to compare the immune capacity of these two groups of animals infected by *V. harveyi* and other pathogens is needed.

Our results represent the first stages of investigation into the molecular response of mature adults *H. tuberculata* to successive infections by *V. harveyi* via SSH. Future efforts will focus on the search for functional polymorphisms in some of the genes identified in this study in natural abalone populations to identify resistant and susceptible animals or populations. Examination of such animals will enable us to characterize the genetic components of resistance to bacterial infection. Future efforts are needed to non-lethally diagnose *V. harveyi* infection prior to loss of muscle attachment to the substrate by developing a quantitative disease scale for *H. tuberculata* vibriosis.

Acknowledgments

The authors are grateful to K.S. Reece for her help during the SSH experiment. This study was supported by 'France Haliotis' SCEA and the 'Région Bretagne'.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jip.2010.08.001.

References

- Arthur, J.C., Lich, J.D., Aziz, R.K., Kotb, M., Ting, J.P.Y., 2007. Heat shock protein 90 associates with monarch-1 and regulates its ability to promote degradation of NF- κ B-inducing kinase. *J. Immunol.* 179, 6291–6296.
- Austin, B., Zhang, X.H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 119–124.
- Azevedo, C., Balseiro, P., Casal, G., Gestal, C., Aranguren, R., Stokes, N.A., Carnegie, R.B., Novoa, B., Burreson, E.M., Figueras, A., 2006a. Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 23–32.
- Azevedo, C., Conchas, R.F., Tajdari, J., Montes, J., 2006b. Ultrastructural description of new Rickettsia-like organisms in the commercial abalone *Haliotis tuberculata* (Gastropoda: Haliotidae) from the NW of Spain. *Dis. Aquat. Org.* 71, 233–237.
- Balseiro, P., Aranguren, R., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2006. Candidatus *Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture* 258, 63–72.
- Beck, G., Ellis, T.W., Habicht, G.S., Schluter, S.F., Marchalonis, J.J., 2002. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm molecule. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 11–26.
- Bezemer, B., Butt, D., Nell, J., Adlard, R., Raftos, D., 2006. Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 627–636.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157.
- Cheng, P., Liu, X., Zhang, G., He, J., 2007. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Fish Shellfish Immunol.* 22, 77–87.
- Co스타우, C., Theron, A., 2004. Resistant or resisting: seeking consensus terminology. *Trends Parasitol.* 20, 209–210.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J.* 272, 5635–5652.
- Dhar, A.K., Dettori, A., Roux, M.M., Klampel, K.R., Read, B., 2003. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cDNA microarrays. *Arch. Virol.* 148, 2381–2396.
- Doherty, C.P., 2007. Host-pathogen interactions: the role of iron. *J. Nutr.* 137, 1341–1344.
- Dong, Y., Taylor, H.E., Dimopoulos, G., 2006. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol.* 4, e229.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B., Lebel, J.M., 2007. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 146, 540–550.
- Funabara, D., 2004. Studies on the regulatory mechanisms involved in catch contraction of molluscan smooth muscles. *Nippon Suisan Gakk.* 70, 508–511.
- Gauger, E.J., Gomez-Chiarri, M., 2002. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. Carchariae*. *Dis. Aquat. Org.* 52, 39–46.
- Gestal, C., Costa, M., Figueras, A., Novoa, B., 2007. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: identification of new antimicrobial peptides. *Gene* 406, 134–143.
- Goarant, C., Herlin, J., Brizard, R., Marteau, A.L., Martin, C., Martin, B., 2000. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 40, 101–107.
- Goldberg, A., Lehman, W., 1978. Troponin-like proteins from muscles of the scallop, *Aequipecten irradians*. *Biochem. J.* 171, 413–418.
- Green, T.J., Dixon, T.J., Devic, E., Adlard, R.D., Barnes, A.C., 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 799–810.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E., Escoubas, J.M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139–145.
- Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R., Coustau, C., 2007. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 657–671.
- Handlinger, J., Carson, J., Donachie, L., Gabor, L., Taylor, D., 2005. Bacterial infection in Tasmanian farmed abalone causes pathology farm factors and control options. In: Walker, P., et al. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture V*.
- Hooper, C., Day, R., Slocumbe, R., Handlinger, J., Benkendorff, K., 2007. Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 363–379.
- Huchette, S.M.H., Clavier, J., 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *J. Shellfish Res.* 23, 951–955.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.-F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211–220.
- Inoue, A., Ojima, T., Nishita, K., 1996. Cloning and sequencing of a cDNA for Akazara scallop troponin T. *J. Biochem.* 120, 834–837.
- Kang, Y.S., Kim, Y.M., Park, K.I., Kim Cho, S., Choi, K.S., Cho, M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1119–1131.
- Lee, K.K., Liu, P.C., Chuang, W.H., 2002. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar. Biotechnol.* (NY) 4, 267–277.
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1151–1191.
- Liu, P.C., Lee, K.K., Chen, S.N., 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22.
- Maiti, B., Khushiramani, R., Tyagi, A., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2010. Recombinant ferritin protein protects *Penaeus monodon* infected by pathogenic *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.* 88, 99–105.
- Meistertzheim, A.L., Tanguy, A., Moraga, D., Thebault, M.T., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS J.* 274, 6392–6402.
- Nicolas, J.L., Basuyaux, O., Mazurie, J., Thebault, A., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 50, 35–43.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T., Wakabayashi, H., 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sculus diversicolor supertexta*. *Fish Pathol.* 33, 495–502.
- Noda, S., Ito, M., Watanabe, S., Takahashi, K., Maruyama, K., 1992. Conformational changes of actin induced by calponin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 481–487.
- Nowak, T., Woodards, A.C., Jung, Y., Adema, C.M., Loker, E.S., 2004. Identification of transcripts generated during the response of resistant *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection using a suppression subtractive hybridization. *J. Parasitol.* 90, 1034–1040.
- Okusu, A., Schwabe, E., Eernisse, D.J., Giribet, G., 2003. Towards a phylogeny of chitons (Mollusca, Polyplacophora) based on combined analysis of five molecular loci. *Organ Divers Evol.* 3, 281–302.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance, degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437–496.
- Pauly, B.S., Drubin, D.G., 2007. Clathrin: an amazing multifunctional dreamcoat? *Cell Host Microbe* 2, 288–290.
- Perrigault, M., Tanguy, A., Allam, B., 2009. Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX). *BMC Genomics* 10, 377.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2003–2007.
- Prado-Avarez, M., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 72–83.
- Ratledge, C., 2007. Iron metabolism and infection. *Food Nutr. Bull.* 28, 515–523.
- Recalcati, S., Invernizzi, P., Arosio, P., Cairo, G., 2008. New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 30, 84–89.
- Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or non-specific? *J. Immunol.* 179, 7209–7214.
- Samain, J.F., McCombie, H., 2007. Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Défi Marest*.
- Schlesinger, M.J., 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 12111–12114.
- Somboonwivat, K., Supungul, P., Rimphanichayakit, V., Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A., 2006. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 26–36.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J.* 272, 390–403.
- Tanguy, A., Guo, X., Ford, S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. Gigas*) oysters. *Gene* 338, 121–131.
- Tiscar, P.G., Mosca, F., 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet. Res. Commun.* 28 (1), 57–62.
- Tolmaskey, M.E., Crosa, J.H., 1991. Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Biometals* 4, 33–35.
- Travers, M.A., Barbou, A., Le Goïc, N., Huchette, S., Paillard, C., Koken, M., 2008a. Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 289, 34–40.
- Travers, M.A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J.L., Koken, M., Paillard, C., 2009a. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Change Biol.* 15, 1365–1376.
- Travers, M.A., Le Bouffant, R., Friedman, C.S., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2009b. Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *J. Cell. Biochem.* 106, 152–160.

- Travers, M.A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008b. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 800–808.
- Wang, K.J., Ren, H.L., Xu, D.D., Cai, L., Yang, M., 2008. Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1326–1347.
- Watson, F.L., Puttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.J., Schmucker, D., 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* 309, 1874–1878.
- Wright, A.C., Simpson, L.M., Oliver, J.D., 1981. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect. Immun.* 34, 503–507.
- Wyckoff, E., Mey, A., Payne, S., 2007. Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biometals* 20, 405–416.
- Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., Stewart Jr., C.N., 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 85–97.
- Zhang, S.M., Zeng, Y., Loker, E.S., 2008. Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*. *Innate Immun.* 14, 175–189.

2. Article : Effets de l'exposition à l'air et de la manipulation

The impacts of handling and air exposure on immune parameters, gene expression, and susceptibility to vibriosis of European abalone *Haliotis tuberculata*

Marion Cardinaud ¹, Clément Offret ¹, Sylvain Huchette, Dario Moraga ¹, Christine Paillard ¹

Abstract

Wild or farmed abalone are regularly exposed to stressors, such as air exposure and handling. Immune and transcriptional responses as well as susceptibility to vibriosis of sexually mature or immature European abalone acclimated at 16 or 19°C were determined following handling or air exposure. Hemocyte density and H₂O₂ production increased while hemocyte viability and phagocytic index decreased following handling. Air exposure induces a decrease of hemocyte density and phagocytic index. Measurement of the expression of genes implicated in general metabolic, immunological and stress responses in gills, foot-muscle and hemocytes by real time q-PCR suggested that both stressors lead to a metabolic rate depression, characterized by a general inhibition of transcription. Finally, following handling a *Vibrio harveyi* challenge enhances almost 100% mortality of sexually immature animals at 19°C while it has been previously demonstrated that only mature are susceptible to vibriosis.

1. Introduction

Wild and farmed populations of the European abalone, *Haliotis tuberculata*, have suffered massive mortalities along the French north Atlantic coasts beginning in the late 1990s. These mortalities occurred when seawater temperature exceeded 17°C and have been attributed to the bacterial pathogen *Vibrio harveyi* (Nicolas *et al.*, 2002.). This vibriosis has generally been reported to develop in sexually mature abalone but not in immature or post-spawning individuals (Travers *et al.*, 2009a). Immune depression characterized by a decrease in hemocyte density, hydrogen peroxide (H₂O₂) production and phagocytosis index measured in spawning European abalone may explain their increasing susceptibility to vibriosis (Travers *et al.*, 2008d). Mortalities have also been observed in farmed animals and in laboratory studies following handling and air exposure (Huchette, pers. comm.; personal observations). The effects of handling and air exposure on the susceptibility to *Vibrio harveyi* of European abalone at different stages of sexual maturity and temperature however remain to be determined. Studies on the impacts of air exposure and mechanical disturbance such as handling or shaking in marine mollusks have mostly focused on immune responses, particularly hemocyte functions (Lacoste *et al.*, 2002.; Pampanin *et al.*, 2002.; Chen *et al.*, 2007.; Bussell *et al.*, 2008.). Hemocyte density, phagocytosis index and production of reactive oxygen species decreased during oxygen deprivation due to nitrogen gazing in the Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* (Cheng *et al.*, 2004c), and after shaking in the European abalone (Malham *et al.*, 2003.), while hemocyte density in the Australian abalone (Hooper *et al.*, 2011.) increased following detachment and handling. Hemocyte responses therefore appear to vary depending on abalone species and stressor types. Furthermore, no study has been conducted on transcriptional effects of air exposure or handling in abalone. Coupling immune and transcriptional analyses should lead to a better understanding of the molecular and cellular responses of the European abalone to handling and air exposure.

Mortalities observed in European abalone after handling and air exposure may be due to a low capacity of the abalone to tolerate these stressors resulting in alterations of immune parameters and transcription of candidate genes, and/or enhancement of invasion by opportunistic pathogen such as *Vibrio* bacteria. Our objectives were therefore to: (i) determine the immune and transcriptional responses of *H. tuberculata* to handling and air exposure, and (ii) assess the impact of these stressors on the development of vibriosis in *H. tuberculata*. Studies were conducted out of the boundary condition of *V. harveyi* infection, i.e. in sexually mature abalone at 16°C and in sexually immature abalone at 19°C.

2. Material and methods

2.1. Study 1: Effects of handling and air exposure on immune and transcriptional responses

2.1.1. Abalone

Three years old abalone (n=36, 42.3 mm ± 2.7) were transported in containers filled with macroalgae *Palmaria palmata* from the *France Haliotis* hatchery in Plouguerneau, France, (francehaliotis.com) to our laboratory at the European Institute for Marine Studies in Brest in September 2011. Sexually mature and immature animals were separated and placed into twelve 5 L aerated seawater tanks (n=4 per tank). Sexually mature abalone had well - developed gonads while the immature abalone were induced to spawn 10 weeks prior to their transfer to our lab and had no visible gonads. The seawater from each tank was replaced daily with seawater pumped from Brest Bay (dissolved oxygen concentration > 7.5 mg. L⁻¹, salinity 34.3-34.7), sand-filtered and UV-sterilized.

2.1.2. Experimental design

Sexually mature abalone were divided into two sets of animals. The first set was kept at 16°C while the second set was acclimated to 19°C by increasing the temperature by one degree Celsius every other day. After three weeks of acclimation, the sexually mature abalone at each temperature were either exposed to air for three hours at room temperature (16.0 ± 0.5°C), or detached, handled and placed down with the foot-muscle upwards, three times over a period of 24 h, or left alone (control). They were then sampled at the same time at the end of the stress period to measure their immune and transcriptional responses. Sexually immature animals were acclimated at 19°C and subjected to the same treatments as the sexually mature abalone and sampled at the same time.

2.1.3. Hemolymph collection and hemocyte analysis

About one milliliter of hemolymph was collected from the pedal sinus of each abalone with a 2.5 mL sterile syringe containing one mL of ice-cold sterile seawater to avoid hemocyte aggregation. Hemolymph was sampled within 30 seconds after removal of individual abalone from each tank to prevent sampling stress and was kept on ice. Five hundred microliters of

hemolymph were centrifuged at 2,500 g for 15 minutes, the supernatant was discarded and the hemocyte pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for gene expression analysis. Hemocyte density, viability, phagocytic index and H₂O₂ production in the remaining 1.5 mL were measured using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, SanJose, CA) equipped with a 488 nm laser as described in Travers *et al.* (Travers *et al.*, 2008d).

2.1.4. Gene expression analysis

2.1.4.1. Sampling

Immediately after hemolymph collection, each abalone was labeled, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. After thawing, the gills and the central part of the foot-muscle were dissected in sterile condition, weighed and kept on ice just prior to RNA extraction.

2.1.4.2. RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted in TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and resuspended in RNase-free water. RNAs were quantified by spectrophotometry with a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher scientific, USA) and RNAs quality was assessed using 1% agarose electrophoresis and analysis on an Agilent Bioanalyzer 2100 with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Reverse transcription was done with one µg of RNA from each sample using random hexamer primers and a RevertAid™ kit (Fermentas International Inc., Burlington, Canada). DNA contamination in RNA samples was checked by amplification of a non-reverse transcribed fraction (minus-RT). A minimal difference between minus-RT and cDNA samples was fixed at eight amplification cycles to accept a sample in gene expression results.

2.1.4.3. Selected Genes

Twelve genes were measured by quantitative real time PCR (RT-qPCR): 4 putative reference genes and 8 genes involved in metabolic, immune and stress responses (Table 5). *H. tuberculata* ribosomal protein 18S, actin, Elongation Factor 1 -EF1 and 2 -EF2 genes were selected as putative reference genes as their sequences were available at the time of the study in NCBI database. The algorithm NormFinder was used to identify the reference gene with the most stable expression as described by the developer (Andersen *et al.*, 2004).

2.1.4.4. Primer design and efficiency estimation

Primer sequences for 9 of the selected genes were available in the literature (Table 5). RT qPCR primers of EF1 and ATP synthase FO subunit 6 were designed from cDNA sequences of *H. tuberculata* available in NCBI database. For Macrophage-expressed protein (MEP), a cDNA consensus sequence was created by the software Bioedit Sequence Alignment Editor 7.1.3.0 (Hall, 1999) from other *Haliotis* species. Oligonucleotide primer sequences were designed using Primer express 3.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR efficiency (E) was estimated for each primer pair and each tissue by serial dilutions (from 1/25 to 1/400) of two reference cDNA samples (one mature abalone and one non-mature). The primer efficiency was determined by the slope of the standard curves using the method described by Yuan *et al.*: $E = 10^{[-1 / \text{slope}]}$ (Yuan *et al.*, 2006).

2.1.4.5. Real time q-PCR measurements

RT-qPCR measurements were done as described in Travers *et al.* (Travers *et al.*, 2010). Each run included a negative control in which sterile water replaced cDNA sample, and a reference sample (control) which was made up of a pool of four samples from sexually mature non-stressed abalone acclimated at 19°C.

Results are presented as changes in relative expression normalized to the reference gene using the method described by Pfaffl (Pfaffl, 2001) and determined by the equation:

Relative expression = $E_{\text{target}}^{\Delta C_{\text{ttarget}}(\text{control-sample})} / E_{\text{ref}}^{\Delta C_{\text{tref}}(\text{control-sample})}$, where E_{target} is the amplification efficiency of the target or gene of interest, E_{ref} is the amplification efficiency of the reference gene and Ct is the cycle threshold.

Statistics tests were done using JMP 10.0.0 software (SAS Institute Inc.).

A non-parametric Wilcoxon test was used to estimate the effects of stressor type, temperature and gonad maturity on the immune and transcriptional response of sexually mature abalone acclimated at 16°C or at 19°C, and immature abalone acclimated at 19°C. Then, pairwise comparisons were made using a Wilcoxon signed-rank test (Wilcoxon, 1945) .

A discriminant analysis was executed on the integrality of RT-qPCR results to visualize global transcriptional impact of handling and air exposure in the different groups of individuals (Lachenbruch and Goldstein, 1979).

2.1. Study 2: Effects of handling and air exposure on European abalone susceptibility to vibriosis

Four hundred twenty abalone (3 years old, 44.1 mm \pm 3.5) were obtained in May 2012 from *France Haliotis* hatchery as described in study 1. Sexually mature and immature animals were separated, placed in 5 L sterilized seawater tanks (10 animals per tank) at 16°C, and immediately treated with chloramphenicol at the final concentration of 2 mg/mL for 24 h (Fig. 26). The seawater from each tank was replaced daily with seawater pumped from Brest Bay and filtered at 0.2 μ m. Sexually immature abalone showed no visible sign of gonad development while sexually mature animals had large gonads.

The sexually mature abalone were separated into 6 groups placed at 16°C, and 2 groups that were acclimated progressively to 19°C following a one degree Celsius increase every other day. Each group was composed of 30 animals that were divided equally into three tanks. Thermal acclimation was done in one week. One group of sexually mature abalone acclimated at 19°C was challenged with *V. harveyi* strain ORM4 for 24 h in a bath of 10⁵ CFU.mL⁻¹ (positive control) while the other group was not infected (negative group) (Fig 26). Among sexually mature abalone placed at 16°C, two groups were exposed to three successive detachments and handling in 24 h, two groups were air-exposed during 3 h and no stress was applied in the last two groups (Fig 26). For each stress condition, one group was challenged with *V. harveyi* strain ORM4 for 24 h in a bath of 10⁵ CFU.mL⁻¹ and one group was not challenged (Fig1).

Using the same procedure described for sexually mature abalone, 6 groups of 30 sexually immature animals were acclimated to 19°C during one week, subjected to handling or air exposure, and finally challenged or not. Moribund animals were counted and removed from the tanks.

Survival curve comparison were performed with a Kaplan-Meier analysis followed by a log-rank test (Kaplan and Meier, 1958; Mantel, 1966).

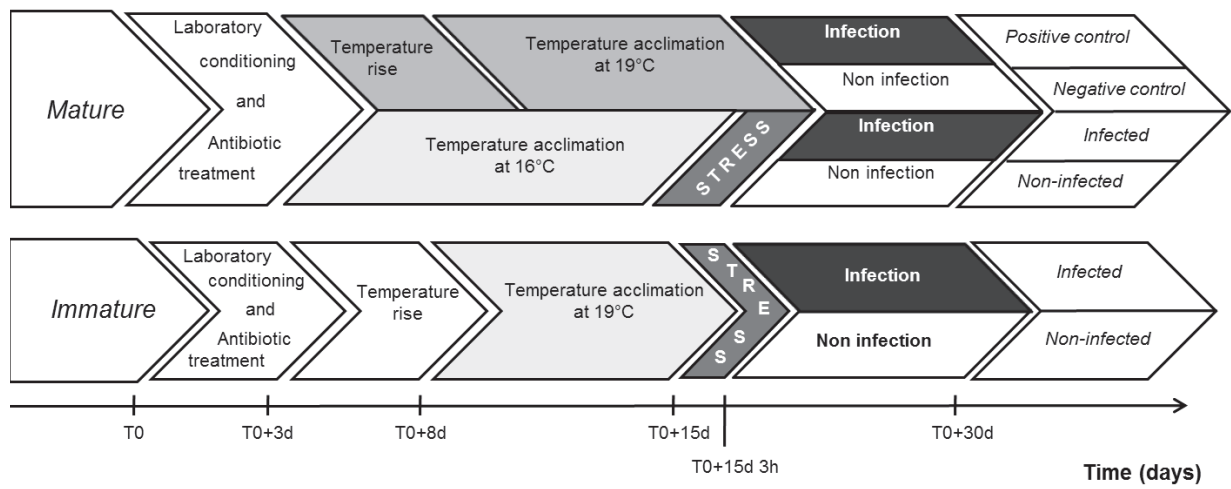


Fig. 26: Simplified experimental design to determine the effects of handling or air exposure stress on the susceptibility of abalone *H. tuberculata* to *V. harveyi*.

Hatchery transferred animals were maintained in the laboratory, treated by antibiotic, acclimated at 19°C or at 16°C during one week, stressed or not stressed and challenged or not challenged with *V. harveyi*, as described in the paragraph 2.2.

3. Results

3.1. Stress effects on hemolymph immune parameters

Hemocyte density depended on stressor type and gonad maturity (Fig. 27A, Table 7). Hemocyte density increased in all groups that were handled (Fig. 27A). The variation in hemocyte density was particularly noticeable in sexually immature animals which showed a tenfold increase in hemocyte density following handling compared to controls (i.e., not handled or exposed to air, Fig. 27A).

Hemocyte viability depended on stressor type, temperature and gonad maturity (Fig. 27B, Table 7). Both handling and air exposure led to a decrease of hemocyte viability (Fig. 27B) in all abalone groups. Hemocyte viabilities in sexually immature and mature abalone at 16°C exposed to stressors were half that of controls (i.e., not handled or exposed to air).

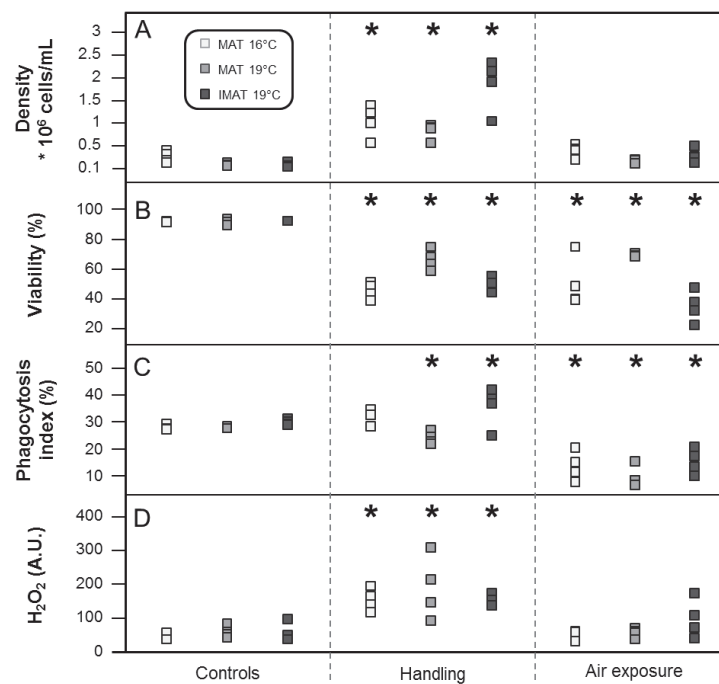


Fig. 27: Fluctuations of hemocytes parameters in *H. tuberculata* following handling or air exposure.

MAT 16°C: sexually mature abalone acclimated at 16°C, MAT 19°C: sexually mature abalone acclimated at 19°C, IMAT 19°C: sexually immature abalone acclimated at 19°C. Density: hemocyte density (A), Viability: percentage of live hemocytes (B), Phagocytosis index: percentage of hemocytes which phagocytized more than 3 beads (C), H₂O₂: hydrogen peroxide production in hemocytes in arbitrary units (A.U.) (D). Statistical analysis was performed by non-parametric Wilcoxon test and differences with corresponding controls were highlighted by asterisks (*) if statistically significant at p < 0.05.

Phagocytosis index depended on stressor type, temperature and gonad maturity (Fig. 27C, Table 7). A decrease in phagocytosis index was observed in all air-exposed abalone as well as in sexually mature abalone acclimated to 19°C that were handled compared to controls (Fig. 27C).

Finally, H₂O₂ production was only influenced by stressor type (Fig 27D, Table 7). A significant increase in H₂O₂ production was detected in all abalone groups handled compared to controls (Fig. 27D).

3.2. Stress effects on gene expression profile

3.2.1. Determination of reference genes

The stabilities of four putative reference genes (ribosomal RNA 18S, actin, EF1 and EF2) were tested by NormFinder application (Fig. 28) for all samples and RNA sources. Average expression data (Cp values) for each gene and standard deviation are shown in Table 6. EF2 had the lowest stability value in muscle and gills, and was selected as the reference gene in those tissues. EF1 had the lowest stability value in hemocytes but its standard deviation was higher than EF2, therefore EF2 was used as a reference gene in hemocytes.

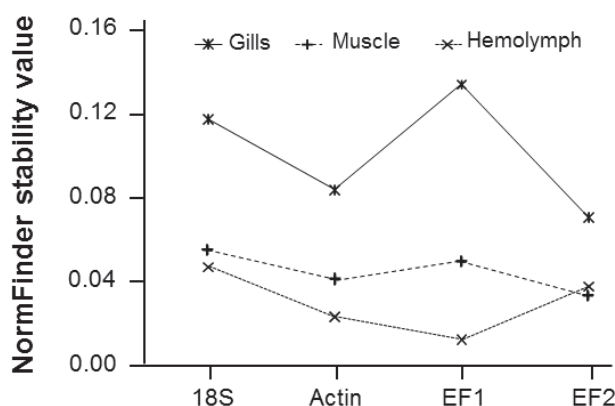


Fig. 28: NormFinder analysis of expression stability of gene encoding ribosomal RNA 18S, Actin, Elongation Factor 1 and 2 (EF1 and EF2) in European abalone *H. tuberculata*.

The better stability between all the putative reference genes is given by the lowest NormFinder value.

3.2.2. *Quantitative analysis of candidate gene expression*

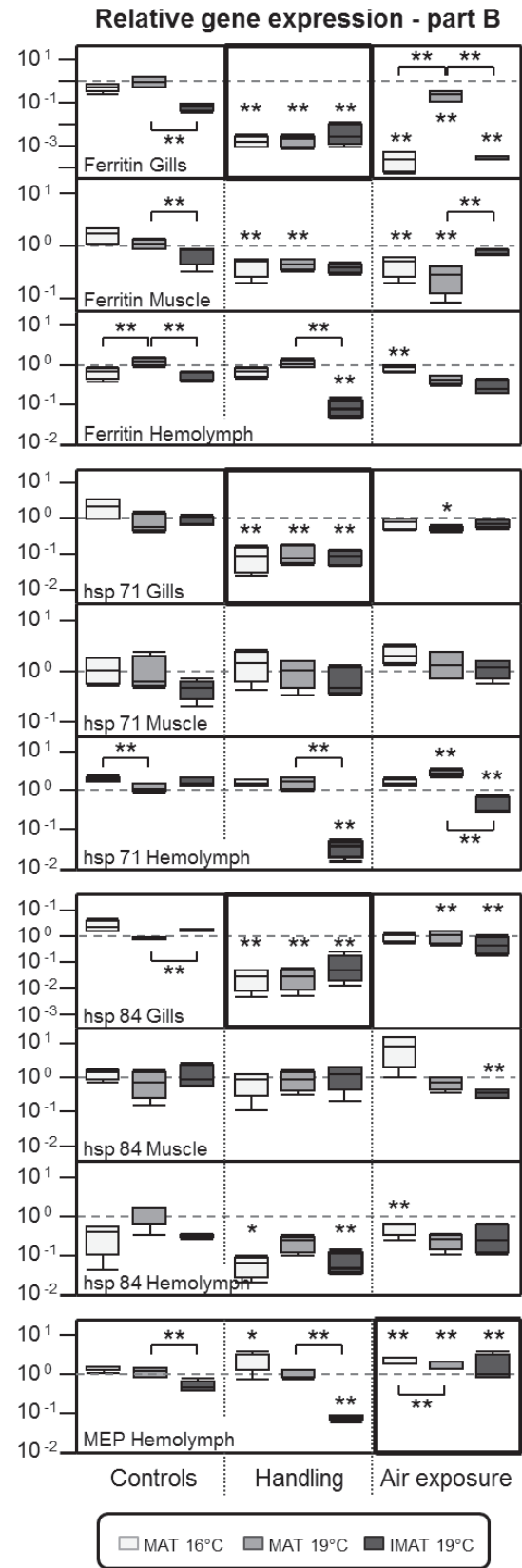
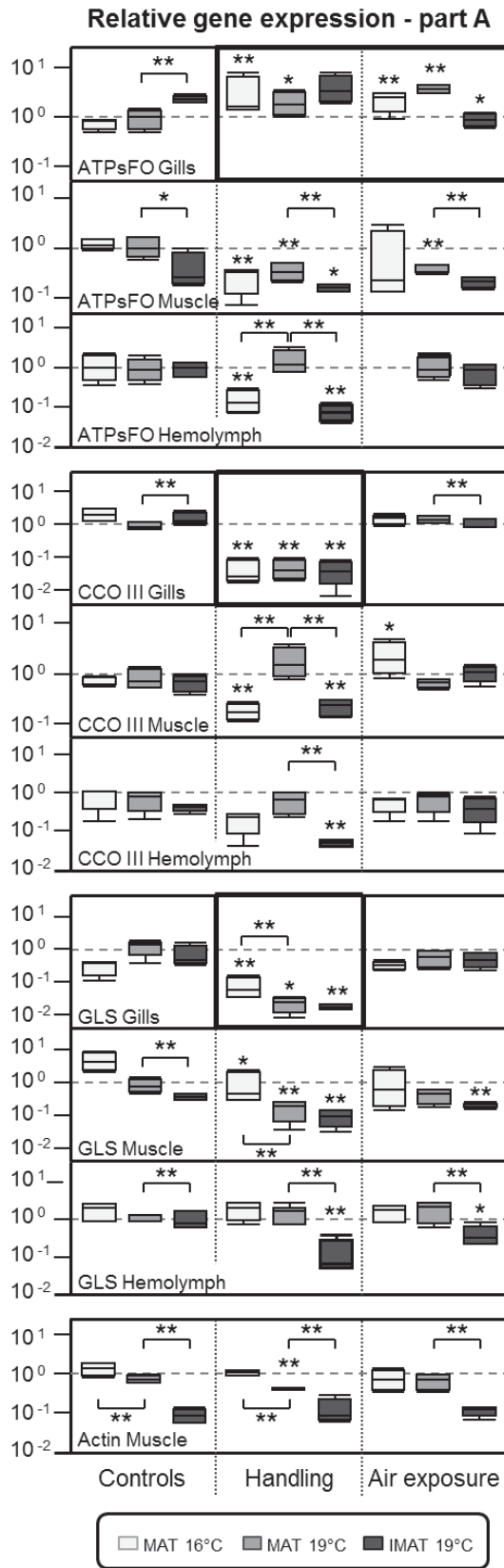
Handling modulated the expression of all selected genes (Fig. 29A & B). The expression of the gene encoding ATP synthase FO subunit 6 was upregulated in gills of sexually mature abalone acclimated at 16°C or at 19°C following handling compared to controls. In contrast, the expressions of all the other genes were downregulated in gills of sexually immature or mature abalone at 16 or 19°C following handling compared to controls. The expressions of all selected genes were downregulated in hemocytes of sexually immature abalone following handling compared to controls. Finally, the expression of genes encoding ATP synthase FO subunit 6 and Glutamine synthase were downregulated in the muscle of abalone following handling compared to controls.

Air exposure for 3 hours modulated the expression of some of the selected genes (Fig. 29A & B). As observed following abalone handling, ATP synthase FO subunit 6 gene expression was upregulated in gills of sexually mature abalone after air exposure (Fig. 29A). The expressions of genes implicated in immune and stress response (Ferritin, hsp70, hsp84) were mostly downregulated after air exposure (Figure 29B) except for MEP gene which was upregulated compared to controls.

Fig. 29: Real time q-PCR analysis of eight candidate genes in sexually mature or immature abalone foot-muscle, gills and hemocytes following handling or air exposure.

MAT 16°C: sexually mature abalone acclimated at 16°C, MAT 19°C: sexually mature abalone acclimated at 19°C, IMAT 19°C: sexually immature abalone acclimated at 19°C. The relative gene expression was calculated by the Pfaffl's method (Pfaffl, 2001) using Elongation Factor 2 as reference gene and relative to expression of non-stressed and sexually mature individuals acclimated at 19°C. Statistical analysis was performed by non-parametric Wilcoxon test and differences were highlighted by an asterisk (*) if statistically significant at $p < 0.1$ or by (**) if statistically significant at $p < 0.05$.

A: expression of genes implicated in general metabolism pathways and encoding Subunit 6 of ATP synthase FO (ATPsFO), Subunit III of Cytochrome c oxidase (CCO III), Glutamine synthase (GLS) and Actin (in muscle); B: expression of genes implicated in immunity and stress response, and encoding ferritin, heat-shock protein 71 (hsp 71), heat-shock protein 84 (hsp 84), and Macrophage-expressed protein (MEP- in hemocytes).



A discriminant analysis (DA) was used to detect differences in overall transcriptional response between each group of abalone (Fig. 30). Wilk's Lambda test confirmed the separation between all abalone groups ($p < 0.001$). Each group could be clustered by stressor type (i.e., handling, air exposure, control). Each group also appeared to cluster into three sets related to gonad maturity and temperature (i.e., sexually immature, sexually mature at 19°C and sexually mature at 16°C)

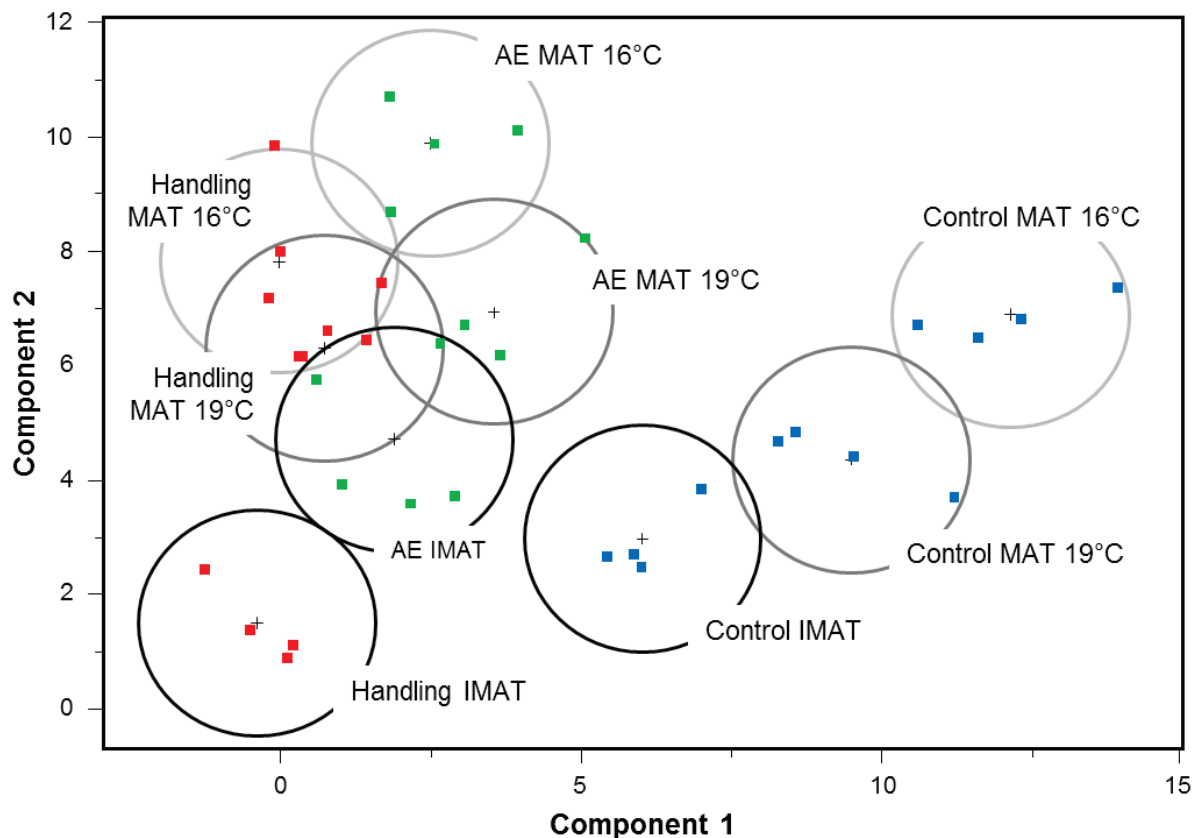


Fig. 30: Discriminant analysis of the gene expression dataset, classed by abalone groups.

Handling: animals exposed to handling, which were represented by red squares; AE: animals subjected to air exposure, which were represented by green squares, control: non-stressed individuals, which were represented by blue squares. MAT 16°C: sexually mature abalone acclimated at 16°C which were enclosed in clear circles, MAT 19°C: sexually mature abalone acclimated at 19°C which were enclosed in grey circles, IMAT: sexually immature abalone acclimated at 19°C which were enclosed in dark circles.

3.2.3. Stress and susceptibility to *Vibrio harveyi* in European abalone

Seventy seven percent of sexually mature animals challenged with *V. harveyi* at 19°C (i.e., positive controls) died after five days while no mortality was observed in those not challenged (negative control) (Fig. 31). Sexually mature animals at 16°C challenged with *V. harveyi* did not suffer any mortality (data not shown).

After handling, mortality rate of *V. harveyi*-challenged sexually immature abalone at 19°C reached 93 % (just one individual survived) while it was only 13% in those not challenged (Fig. 31). Non-stressed (i.e., not handled nor air exposed) immature abalone mortality rate was 24% after challenge with *V. harveyi* at 19°C compared to 0% in the not challenged ($p=0.005$) (Fig. 31). No difference could be shown between the mortality rate of air-exposed animals challenged with *V. harveyi* or not (Fig. 31).

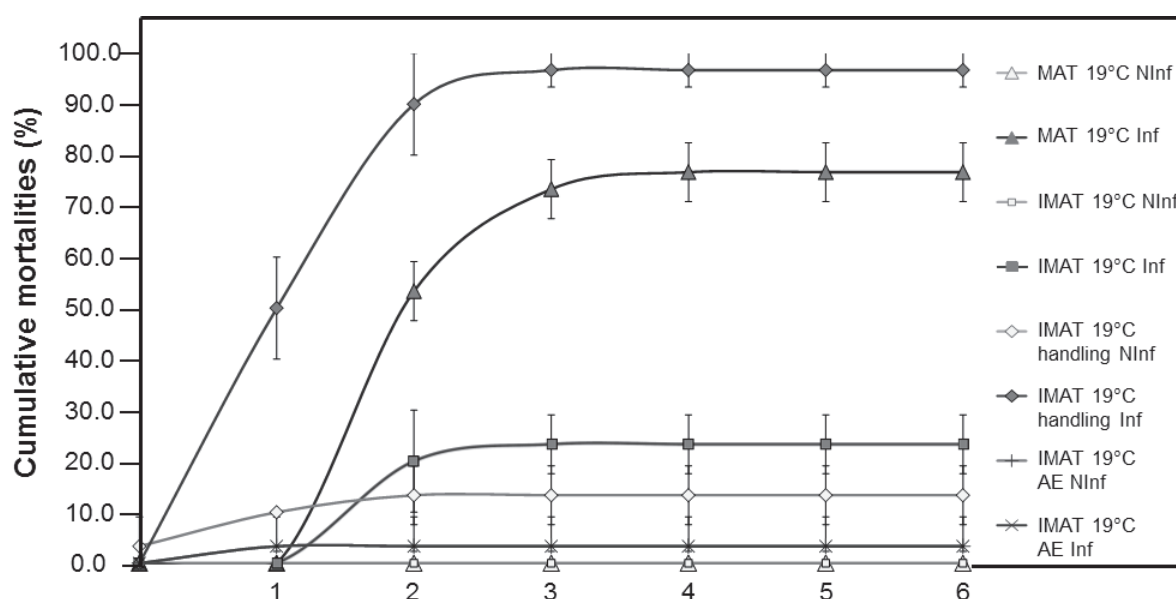


Fig. 31: Cumulative mortalities of sexually mature and immature European abalone following exposure to stress (handling, air exposure) and challenge with *V. harveyi*.

Results are the average \pm standard deviation of three experimental triplicates. PID: post-infection day. Handling: animals exposed to handling, AE: animals air-exposed. MAT 19°C: sexually mature abalone acclimated at 19°C, IMAT 19°C: sexually immature abalone acclimated at 19°C. NInf: non-infected animals, Inf: infected animals.

4. Discussion

Results of study 1 showed that handling and air exposure had an impact on immune and transcriptional responses of European abalone. Both stressors decreased hemocyte viability. Handling led to an increase in hemocyte density and H₂O₂ production while air exposure decreased the phagocytosis index in all abalone regardless of gonad maturity or temperature. Transcriptional analyses indicated that: (i) handling induced a downregulation of the expression of most of the selected genes involved in general metabolism, immune and stress responses, especially in the gills, and in the hemolymph of sexually immature abalone; (ii) a three hour exposure to air induced a downregulation of expression of selected genes involved in immune and stress responses. Moreover, the discriminant analysis identified differences in the transcriptional profile between stressed and control animals, between abalone exposed to the two type of stressors (i.e., air exposed *vs* handled), and between all groups in relation to gonad maturity and temperature (Fig. 5). Finally, challenge with *V. harveyi* showed that sexually immature abalone are only susceptible to vibriosis following handling.

A drastic reduction of hemocyte viability was observed after exposure to both stressors, which suggests that this parameter is a sensitive marker of stress response in European abalone. Cell death is induced through endogenous pathways in response to internal cellular damages and/or exogenous stimuli such as environmental stressors (Feig and Peter, 2007). Following handling, the significant decrease in hemocyte viability was also accompanied by a significant increase in H₂O₂ production. The reduction in hemocyte viability might be due to oxidative damage or induction of apoptotic pathways from ROS (Terahara and Takahashi, 2008). Increasing hemocyte density may indicate an activation of hematopoiesis and/or recruitment from peripheral tissues after handling as has also been reported in the Australian abalone (Hooper *et al.*, 2011). The diminution of hemocyte density from peripheral epithelial tissues may however increase vulnerability to pathogen entry and increase disease susceptibility.

Phagocytic activity decreased following air exposure but not handling in our study. Reduction in hemocyte phagocytic index and viability was also reported in the scallop *Chlamys farreri* (Chen *et al.*, 2007) after 2h of air exposure. Phagocytosis is a crucial cellular mechanism for immune functions in invertebrates, and is a sensitive immunomarker of oxygen deprivation in marine mollusks (Pampanin *et al.*, 2002; Matozzo *et al.*, 2005; Malagoli *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010) and of general stress in abalone species (Hooper *et al.*, 2007a). A connection was established between stress and inhibition of phagocytosis in *C. gigas* via biogenic amine (noradrenaline, adrenaline and dopamine) release into hemolymph (Lacoste *et al.*, 2001).

Noradrenaline and dopamine increase in abalone hemolymph have been reported in the first few minutes after inducing stress (Malham *et al.*, 2003). Although the relationship between neuroendocrine mediator production and hemocyte competence was not studied here, air exposure may induce this type of response in abalone. The reduction of phagocytic index in our study following air exposure may explain the observed decrease in hemocyte viability after air exposure; the ability of hemocytes to remove dead cell may be decreased as previously hypothesized during sudden temperature elevation in *C. virginica* (Hegaret *et al.*, 2003) and in *Perna viridis* exposed to hypoxia and hyposalinity (Wang *et al.*, 2012).

A decrease of gene expression was observed as a result of both stressors and this suggests that air exposure and handling lead to a mechanism of transcriptional control in European abalone. Such a transcription regulation is characteristic of a metabolic rate depression which is a common strategy for organisms exposed to high environmental or physiological constraints including oxygen deprivation (Storey and Storey, 2007). Larade and Storey, for example, showed that the intertidal mollusk *Littorina littorea* drastically reduced ATP-expensive cellular process of transcription after anoxic exposure (Larade and Storey, 2007). While this mechanism is well known as an oxygen deprivation adaptation, metabolic rate depression following handling in invertebrates had not been previously reported until now. Further studies on the effects of handling on gene expression regulation in marine mollusks should be done to better understand: (i) how this stressor alters earlier physiological response by measuring the expression of genes involved in general metabolism and cellular stress pathways; and (ii) if depression of metabolic rate can be considered as an adaptation or the sign of a low tolerance to handling in mollusk. Answers to these questions may help develop strategies and tools to reduce the impacts of stressors in aquaculture practices or laboratory experiments.

The trend of transcription inhibition was not observed for two target genes: ATP synthase FO subunit 6 and Macrophage-Expressed Protein. The ATP synthase is a mitochondrial membranous enzymatic complex which catalyzes ATP production in the presence of a proton electrochemical potential difference, generated by respiratory chain. An upregulation of mitochondrial gene expression occurs frequently during metabolic rate depression (Storey, 2005). In the current study, an upregulation of ATP synthase FO subunit 6 gene expression was observed in stressed mature abalone and may be due to the necessity of providing a

minimal supply of ATP during reproduction. The overexpression of MEP was induced in all groups of air-exposed abalone. MEP homologues were characterized in four abalone species and possess structural similarities with mammalian Mpeg1 perforin (Mah *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008a; Kemp and Coyne, 2011). The regulation of Mpeg1 mRNA expression in marine invertebrates during challenge with bacteria or LPS suggests that this protein constitutes an effector in innate immune response to counteract invading pathogens (Wiens *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008b; He *et al.*, 2011). In European abalone, the upregulation of Mpeg1 homologue expression suggested that oxygen deprivation stimulates molecular immunity. Thus, a depression of metabolic rate may preserve some host-defense mechanisms during air exposure.

Several authors have previously established that environmental factors, human activities or intrinsic conditions influence disease resistance in marine organisms (Hayashi, 1983; Le Moullac *et al.*, 1998; Lacoste *et al.*, 2001; Parry and Pipe, 2004; Pereira *et al.*, 2006; Gagnaire *et al.*, 2007; Travers *et al.*, 2008d). Moreover, successive studies accomplished by Cheng *et al.* reported an increase in vibriosis susceptibility in the Taiwan abalone exposed to elevated temperature, fluctuating salinity, high concentrations of organic compounds, and reduced oxygen levels (Cheng *et al.*, 2004a; Cheng *et al.*, 2004b; Cheng *et al.*, 2004c; Cheng *et al.*, 2004d; Cheng *et al.*, 2004e). Our results provided information on the specific conditions of vibriosis development in *H. tuberculata*. Notably, we found that sexually immature animals exposed to handling were particularly susceptible to *V. harveyi* after challenge at 19°C. A previous study had shown that only sexually mature abalone, which had depressed immune functions following spawning, were vulnerable to vibriosis. Our results demonstrated that handled abalone that showed alteration in immune parameters and inhibition of transcription may also be susceptible to vibriosis independent of gonad maturity. Moreover, neither air exposure nor handling of abalone at 16°C was associated with the development of vibriosis. These results supplement studies completed by Travers *et al.* (Travers *et al.*, 2009a) and validates the major importance of temperature for the vibriosis development in *H. tuberculata*.

5. Conclusion

The current study has improved our knowledge on handling and air exposure impact on immune and transcriptional response, and on susceptibility to *V. harveyi* challenge in European abalone. Immune and transcriptional responses were stressor-dependent in European abalone. Following air exposure, the main results showed a reduction of hemocyte density and phagocytic index of functional hemocytes and an expression inhibition of genes implicated in stress response. Handling caused an alteration of all the immune parameter levels and an expression inhibition of genes implicated in general metabolism, immune and stress responses. Experimental infections on stressed animals revealed new information on conditions of vibriosis enhancement in *H. tuberculata*. Indeed, handling may support vibriosis development in sexually immature abalone which are not susceptible to vibriosis under non-stressing conditions. It would be interesting to conduct further studies on the impact of handling on the development of other diseases or parasitosis in abalone. Stressor exposure may also have an impact on abalone behaviour (eating, reproducing, and competing). Therefore physiological and immune analyses may be combined with behavioral observations to assess the general influence of environment quality on individual performances.

Acknowledgments

This study was supported by Pôle Mer Bretagne and the Université de Bretagne Occidentale. We are also grateful to Philippe Miner from the LEMAR for his technical support during animal experimentation and to Jerome La Peyre from the School of Animal Sciences of LSU AgCenter (Baton Rouge, Louisiana, USA) for language support.

Table 5: Primer sequences used in real time qPCR analysis.

Gene name	Sequence (sense and antisense)	Source	Metabolism
Ribosomal protein 18S	AGAAACGGCTACCACATCCAA TTCGTCACCTCCTCGTATCG	Travers et al, 2010 ^a	Reference gene
EF1	GGCCACGGTCTGCTTCAT TTTCTCCTCCTACCCACCATTG	this study	Reference gene
EF2	ATGGAGTTTTGTGCGATGAGAA TCGGCGTGGAGAGTCACAT	Travers et al, 2010 ^a	Reference gene
Actin	GCCTCTCTGTCCACCTTCCA GGGCCGGACTCATCGTACT	Farcy et al, 2007 ^b	Reference gene / muscular activity
ATP synthase FO	CTCTGCTCAGCCATCTTTATTTACC CAGGGACACACCGATTTTCG	this study	Energetic metabolism
Cytochrome c oxidase III	TTGGAAACCTTCTTTTTTATCACCTT TTCCAAGTTCCCCTCCTCAA	Travers et al, 2010 ^a	Cellular respiration
Glutamine synthase	GCGACACCTGCCGAGAAGT AGTTATTGAAGAAGCCATCGAGAGA	Travers et al, 2010 ^a	General metabolism
Macrophage-expressed protein	AGGTWGCTTCGCTRTGGT TCAYTCCTGCTGGYTGTCT	this study	Immunity
Ferritin	CGTGACGACTGGGCATTACTC GGACCACATCACCAACCTGAA	Travers et al, 2010 ^a	Stress response / Immunity
Heat-shock protein 71	5' CGGTGAGCGCAATGTTC 3' 5' CCAAGTGGGTGTCTCCA 3'	Farcy et al, 2007 ^b	Stress response
Heat-shock protein 84	GATTCGCCATTCGGTTTGTT TGTGGCGATGTTATTGTTGGA	Travers et al, 2010 ^a	Stress response

a (Travers *et al.*, 2010),

b (Farcy *et al.*, 2007)

Table 6: Variability of real time q-PCR data (Cp value) for four putative reference genes in European abalone *H. tuberculata*. Values in bold correspond to the mean with the smallest standard deviation (sd) and * indicate the best reference gene according to the NormFinder application.

RNA source	Gene name	Cp value (Mean \pm sd)
Muscle	18S	17.71 \pm 1.55
	actin	17.89 \pm 1.20
	EF1	17.22 \pm 0.97
	EF2	18.70 \pm 0.84 *
Gills	18S	15.60 \pm 1.94
	actin	19.45 \pm 1.93
	EF1	17.42 \pm 4.80
	EF2	19.73 \pm 0.75 *
Hemolymph	18S	14.48 \pm 1.31
	actin	25.26 \pm 1.64
	EF1	22.39 \pm 1.20 *
	EF2	24.57 \pm 0.43

Table 7: Results of the Wilcoxon comparisons showing significant differences in the changes of immune parameters between (i) sexually mature abalone acclimated at 19°C and at 16°C (MAT 19°C and MAT 16°C) and (ii) sexually mature and immature abalone acclimated at 19°C (IMAT 19°C and MAT 19°C). Abalone hemolymph was sampled from animals that were detached three times and handled during a 24 h period, air-exposed for 3 h, or neither handled nor air-exposed (i.e., control. The immune parameters measured by flow cytometry were hemocyte density, viability (%), phagocytosis index (%) and H₂O₂ production.

	MAT 16°C and MAT 19°C	IMAT 19°C and MAT 19°C
Density		
Stress	0.0002	< 0.0001
Control vs handling	0.0009	0.0009
Control vs air exposure	0.0831	0.0028
Handling vs air exposure	0.0009	0.0009
Temperature	0.0833	
Stress x temperature	0.9665	
Ripeness		0.0014
Stress x ripeness		0.0013
Viability		
Stress	0.0004	< 0.0001
Control vs handling	0.0009	0.0009
Control vs air exposure	0.0009	0.0009
Handling vs air exposure	0.4948	0.7929
Temperature	0.0941	
Stress x temperature	0.0272	
Ripeness		< 0.0001
Stress x ripeness		< 0.0001

Phagocytosis index

Stress	0.0003	< 0.0001
Control vs handling	0.2271	0.4309
Control vs air exposure	0.0009	0.0009
Handling vs air exposure	0.0009	0.0009
Temperature	0.0294	
Stress x temperature	0.0478	
Ripeness		0.0117
Stress x ripeness		0.0144

H₂O₂ production

Stress	0.0004	0.0017
Control vs handling	0.0009	0.0009
Control vs air exposure	0.5635	0.4948
Handling vs air exposure	0.0009	0.0101
Temperature	0.4189	
Stress x temperature	0.4444	
Ripeness		0.8396
Stress x ripeness		0.1572

B- Discussion générale

Le premier article rapporte les résultats de l'étude de la réponse transcriptomique chez l'ormeau européen suite à deux expositions successives à l'agent pathogène *V. harveyi*.

La construction de banques soustractives a été effectuée entre des animaux résistants à deux infections successives, des animaux sensibles et des animaux témoins non mis en présence de *V. harveyi* (Fig. 24).

Parmi l'ensemble des séquences identifiées par la technique des banques soustractives, celles de 65 gènes ont pu être homologuées avec des gènes connus chez d'autres espèces, et ont donc été identifiées pour la première fois chez l'espèce *H. tuberculata*. Des différences d'expression de gènes impliqués dans des voies métaboliques majeures ont pu être mises en évidence entre les 3 groupes d'ormeaux : résistants, sensibles et contrôles.

La validation de ces résultats par PCR en temps réel a permis de caractériser l'expression des gènes chez ces groupes d'animaux au cours de deux infections successives. Les résultats de PCR montrent quelques tendances d'expression de gènes différentielles :

- les gènes impliqués dans la constitution du cytosquelette, i.e. calponine et troponine, et dans l'endocytose, i.e. clathrine, sont sous-exprimés chez les ormeaux sensibles en comparaison avec les animaux résistants et témoins.

Ce résultat suggère 1/ une régulation de la synthèse des protéines du cytosquelette et de la constitution des fibres musculaires, potentiellement en lien avec la dégénérescence de ces fibres musculaires observées chez des ormeaux infectés ; et 2/ une potentielle altération de la fonction d'endocytose des cellules musculaires et de la phagocytose chez les hémocytes circulants, présents dans les sinus musculaires.

- le même profil est observé chez les gènes impliqués dans la synthèse protéique à l'exception de celui codant la reptine qui présente une tendance à la surexpression chez les animaux sensibles.

Cette inhibition de l'expression des gènes de la synthèse protéique pourrait indiquer une altération de cette fonction chez les animaux sensibles, potentiellement dans le but de limiter la dépense énergétique au profit d'autres fonctions physiologiques importantes telles que la fonction immunitaire. Cette inhibition pourrait également être le révélateur de l'état physiologique déplorable des animaux sensibles à la vibriose, prélevés à l'état moribond.

- l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress, i.e. ferritine et « heat shock protein 84 » (hsp84), est inhibée chez les animaux sensibles et activée chez les résistants par rapport aux témoins. Ces mêmes tendances d'expression sont également observées pour le gène codant pour la sous unité III de la cytochrome c oxydase (COX III) chez les individus résistants, en fin d'infection.

Ces résultats suggèrent 1/ que la réponse au stress peut être une voie physiologique majeure impliquée dans la résistance à la vibriose chez l'ormeau et 2/ une nécessité d'accroître la fonction de respiration cellulaire, potentiellement afin d'augmenter la production énergétique chez les animaux résistants, et suggère donc l'impact énergétique de la résistance à la vibriose.

Notons ici également que la ferritine, protéine clé de l'homéostasie du fer, peut être impliquée dans la réponse au stress en minimisant la production de ROS par la voie de Fenton (Fenton, 1899), et dans la réponse immunitaire en limitant la biodisponibilité du fer, élément essentiel à la croissance des espèces *Vibrio*.

Cette étude a donc permis de détecter des voies métaboliques potentiellement impactées par la vibriose chez l'ormeau européen, telles que l'activité musculaire, la synthèse protéique, la réponse au stress et l'activité immunitaire, la respiration cellulaire et le métabolisme général. Par ailleurs, ce travail a permis de mettre en évidence des marqueurs génomiques de la réponse à la vibriose chez l'ormeau européen, potentiels marqueurs génomiques de la réponse au stress.

Le second article expose l'étude de l'effet de l'exposition à l'air et de la manipulation sur la réponse transcriptomique et immunitaire, et sur la sensibilité à la vibriose chez les ormeaux européens.

A ces fins, les mesures de paramètres immunitaires, densité et viabilité hématocytaires, production en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et indice de phagocytose, ont été effectuées afin d'estimer l'impact de l'exposition à l'air ou à des manipulations sur la fonction immunitaire à l'échelle cellulaire. En parallèle, l'expression de marqueurs génomiques identifiés lors de la première étude présentée dans ce chapitre a été analysée dans différents tissus, afin d'appréhender l'impact potentiel de ces conditions contraignantes sur les voies métaboliques majeures, telles que le métabolisme général et énergétique, la respiration cellulaire, l'immunité et la réponse au stress.

Les résultats montrent que la réponse immunitaire des ormeaux à l'échelle cellulaire est dépendante de la condition contraignante imposée. La densité hématocytaire et la production en H_2O_2 augmentent suite à des manipulations successives alors que la viabilité et l'indice de phagocytose diminuent. L'exposition à l'air entraîne une réduction de la densité hématocytaire et de l'indice de phagocytose, typiques d'une diminution du nombre d'hématocytes fonctionnels dans le liquide circulant.

Les résultats d'expression de gènes suggèrent une dépression générale du métabolisme basal, caractérisée par une inhibition globale de la transcription. Ce processus de limitation de la dépense énergétique par arrêt de la synthèse protéique a été préalablement observé chez d'autres organismes, notamment chez des littorines soumises à une privation d'oxygène (Storey, 1998; Larade et Storey, 2002; Larade et Storey, 2007). Cependant, aucune autre étude n'avait révélé une dépression métabolique en cas de perturbation physique chez un invertébré. Ainsi, des études supplémentaires pourraient être réalisées chez d'autres espèces, afin de vérifier si ce processus est une réelle adaptation à une perturbation physique ou un signe d'une faible tolérance à la manipulation chez l'ormeau.

Enfin, les infections expérimentales par la bactérie pathogène *V. harveyi* chez des ormeaux soumis à l'exposition à l'air et à des manipulations, ont révélé de nouvelles informations sur le développement de la vibriose chez l'ormeau européen. En effet, la manipulation semble engendrer la sensibilité des ormeaux sexuellement immatures, non sensibles en conditions non contraignantes. Ce constat indique que la sensibilité à la vibriose est non seulement influencée par l'état de maturité sexuelle des ormeaux mais également par leur état physiologique et immunitaire. Travers et collaborateurs avaient préalablement mis en évidence une dépression de l'immunité des ormeaux en période de ponte et émis l'hypothèse selon laquelle cette dépression immunitaire serait à l'origine de la sensibilité de l'espèce à la vibriose (Travers *et al.*, 2008.). Les résultats présentés ici corroborent cette hypothèse et suggèrent également que la dépression du statut physiologique et immunitaire de l'ormeau est le facteur-hôte à prendre en compte lors des études de cette interaction hôte-parasite.

Notons également que les ormeaux soumis à l'exposition à l'air ou à la manipulation ne sont pas sensibles à la vibriose lorsqu'ils sont placés à 16°C. Ce résultat confirme l'importance fondamentale de la température sur le développement de cette maladie chez l'ormeau européen. Si le travail de thèse de Marie-Agnès Travers démontre que la température influence la croissance de l'espèce pathogène *V. harveyi* et l'immunité des ormeaux, à ce jour aucune étude n'a pu clairement révéler quel était, précisément, son impact sur le développement de l'infection et sur la réussite du cycle infectieux.

Ces deux études montrent donc l'influence des conditions environnementales ou anthropiques et de la présence de parasites sur la physiologie des ormeaux européens, à l'échelle moléculaire et cellulaire. La manipulation des animaux et leur acclimatation à des températures supérieures à 17°C favoriseraient le déclenchement de la vibriose et donc induirait des mortalités massives.

Ces données sont, notamment, à prendre en compte dans les structures haliticoles afin de mettre en place des pratiques les moins préjudiciables possibles pour la survie des animaux et donc la rentabilité de l'exploitation.

Second chapitre :

Cycle infectieux de *Vibrio harveyi* chez l'ormeau européen, température, et facteurs de virulence potentiels

A-Introduction

V. harveyi est une espèce pathogène de nombreux organismes marins, chez lesquels elle provoque généralement des gastro-entérites, des vasculites et des lésions tissulaires et induit une septicémie fatale (Austin et Zhang, 2006; Austin, 2010). Malgré son importance en tant que parasite du milieu marin et problème majeur pour la rentabilité des structures aquacoles, aucune étude n'a précisément mis en évidence le cycle infectieux de cette bactérie chez son hôte. Chez l'ormeau européen, les travaux de thèse de M-A. Travers ont montré que *V. harveyi* est présent en amas bactériens dans le muscle pédieux, est retrouvé dans les filaments branchiaux et en concentration massive dans l'hémolymphe (Travers, 2008) dès 48h après contact. Cette observation suggère que les premières phases du cycle infectieux, i.e. la phase d'adhésion puis de pénétration ont lieu dès les premières heures de contact. Afin de vérifier cette hypothèse, il semble dans un premier temps nécessaire de connaître la temporalité de la phase d'initiation de l'infection, i.e. d'estimer le temps de contact nécessaire au déclenchement de la vibriose chez l'ormeau. Ensuite, une étude de la voie d'entrée potentielle de *V. harveyi* chez l'ormeau et des organes ciblés par la bactérie au cours d'un cycle d'infection doit être réalisée.

Une souche luminescente issue de l'insertion d'un plasmide GFP dans la souche sauvage ORM4 (Travers *et al.*, 2008a), pathogène de l'ormeau européen, a donc été utilisée afin de 1/ détecter son accumulation et son tropisme potentiel au niveau d'organes particuliers, et 2/ quantifier sur milieu sélectif les vibrions ayant adhéré ou ayant pénétré ces différents organes. La mise au point d'une méthode de quantification dans les tissus par PCR quantitative a été effectuée, dans un second temps, et a permis de révéler la dynamique d'infection de *V. harveyi* chez l'ormeau européen.

Ces résultats seront présentés dans **l'article 3** de ce manuscrit et soumis à [FEMS Journal](#).

Par ailleurs, afin de mieux comprendre l'importance de la température dans cette interaction entre l'ormeau européen et son parasite *V. harveyi*, il semblait fondamental de répondre à deux questions :

- quelle(s) phase(s) de l'infection est (ou sont) thermo-dépendante(s) ?
- quelle relation existe-il entre virulence, i.e. capacité à induire des mortalités chez l'hôte, et température ?

En balnéation, Travers et collaborateurs ont estimé que seule la souche pathogène ORM4 induit des mortalités chez l'ormeau européen lorsque la température dépasse 17°C, suggérant ainsi l'importance de la température dans le développement de la maladie (Travers *et al.*, 2009a; Travers *et al.*, 2009b). Cependant, ces résultats n'attestent pas une causalité directe entre la température et la virulence de *V. harveyi*, mais peuvent s'expliquer par l'influence de la température sur la physiologie des ormeaux. Dans la perspective d'apporter de nouvelles informations sur ce dernier point, des infections expérimentales par injection de doses croissantes de la souche OMR4, pathogène, ou de la souche LMG 7890, considérée comme non pathogène, ont été effectuées chez des ormeaux sexuellement immatures, placés à 16 et à 19°C. L'intérêt de procéder à des injections réside dans le fait que la phase d'adhésion et de pénétration de la bactérie est annihilée. A la suite de ces injections, les ormeaux morts ont été retirés des bacs et dénombrés deux fois par jour pendant 8 jours d'infection. Une analyse par la méthode Kaplan-Meier a été ensuite réalisée afin de connaître l'influence des doses en vibrions et de la température, sur les mortalités engendrées (Kaplan et Meier, 1958). Cette étude a été réalisée en collaboration avec Emilie Baugin, stagiaire de Master 1^{ère} année.

Enfin, une analyse préliminaire des facteurs de virulence potentiels de la souche OMR4 de *V. harveyi* sera exposée dans ce chapitre. En effet, les séquençages complets des génomes de cette souche et de la souche LMG 7890, ont été réalisés au Génoscope de Rennes et financés par un programme de la région Bretagne, sous la responsabilité de Christine Paillard. L'analyse soustractive *in silico* des génomes des deux souches a permis de révéler un panel de gènes potentiellement impliqués dans la virulence de la souche ORM4, chez l'ormeau européen. Dans ce chapitre, ces facteurs de virulence potentiels seront reliés à leur implication potentielle au cours du cycle infectieux.

Ces analyses seront présentés dans la partie « **Résultats complémentaires** » de ce chapitre.

B- Résultats

1. Article 3 : Voie d'entrée et dynamique d'infection de *V. harveyi* chez l'ormeau européen *H. tuberculata*

Portal of entry and infection dynamics during the earlier stages of vibriosis in European abalone *Haliotis tuberculata*

Marion Cardinaud, Annaïck Barbou, Coralie Alain, Carole Capitaine, Adeline Bidault-Toffin, Antoine Dujon, Christine Paillard.

Abstract

Vibrio harveyi is a marine bacterial pathogen responsible for episodic epidemics generally associated with massive mortalities in many marine organisms including the European abalone *Haliotis tuberculata*. The aim of this study was to identify the portal of entry and the dynamics of infection of *V. harveyi* in the European abalone.

The results indicate that the time of contact between *V. harveyi* and the European influenced the mortality rate and the precocity of mortality appearance. Immediately after contact, the epithelial and mucosal area situated between gills and the hypobranchial gland is being colonized by *V. harveyi*. Quantitative PCR and culture quantification of *V. harveyi* revealed a high density of bacteria adhering then penetrating the whole gill-hypobranchial gland tissues at one hour post-contact. *V. harveyi* was also detected in significant number in hemolymph of abalone after 3 hours of contact.

The results suggest that the adherence then penetration of *V. harveyi* in European abalone begin in the first hours of contact. We hypothesize that the portal of entry of *V. harveyi* in the European abalone was the epithelial area situated near the gills and the hypobranchial gland. This observation needs to be further developed notably to localize the portal of entry more precisely.

1. Introduction

The halophilic Gram-negative bacterium *Vibrio harveyi* is a common pathogen of many marine vertebrate and invertebrate species (Austin and Zhang, 2006). *V. harveyi* is known principally to induce gastro-enteritis, inflammation of the circulatory system or eye and skin lesions in its hosts (Austin, 2010). In the European abalone *Haliotis tuberculata*, *V. harveyi* is responsible for massive mortalities that occur during the spawning period (Nicolas *et al.*, 2002.; Travers *et al.*, 2009.). Vibriosis of the European abalone is characterized by the presence of white spots on the foot and inflammation of the pericardial tissue, then results in an incapability of mobility and a septicemia (Travers *et al.*, 2008a).

Generally, the bacterial infection process can be summarized in three stages: 1/ adhesion of the pathogen to the host surface, then its penetration inside the body through one or several portals, 2/ invasion and multiplication of the pathogen inside the host organs and/or the circulatory system (Mims *et al.*, 2002), and 3/ exit of the pathogen and transmission of the disease. According to the study done by Travers *et al.*, the stage of invasion and multiplication of *V. harveyi* inside the host, notably in hemolymph, takes place after 24h post-contact with the European abalone (Travers *et al.*, 2008a). This observation suggests that *V. harveyi* adhere then penetrate the European abalone before the first 24h post-contact. A precise timing of the earlier stages of *V. harveyi* infection in the European abalone, and the portal of entry of *V. harveyi* remain to this day uncharacterized.

Many studies which focused essentially on infection dynamics of fish pathogens have been revealing a wide variety of infection modalities in *Vibrio* species. For example, *V. anguillarum* seems to penetrate preferentially through the gastro-intestinal tract in the turbot *Scophthalmus maximus* (Olsson *et al.*, 1996), while both skin and gills are respectively the portal of entry in the Atlantic Salmon *Salmo salar* (Svendson and Bogwald, 1997) and in the rainbow trout *Salmo gairdneri* (Laurencin and Germon, 1987). In marine mollusks, the organic matrix of the shell may be a putative portal of entry of *Vibrio* pathogen, as observed with *V. tapetis* which is known to invade *Ruditapes phillipinarum* clams after adherence on the periostracal lamina shell and the extrapalleal fluid (Paillard and Maes, 1995; Allam *et al.*, 2002). Considering the different modalities of infection in pathogenic *Vibrio* species, the objectives of this study are to localize and verify the existence of a portal of entry of *V. harveyi* in the European abalone and determine the infection dynamics during the earlier stages of vibriosis.

2. Material and methods

2.1. Abalone and bacterial strains

Adult abalone were transported in containers filled with macroalgae *Palmaria palmata* from France Haliotis hatchery, Plouguerneau, France (francehaliotis.com) to our laboratory at the European Institute for Marine Studies, Brest, France in June 2011. They were placed in 5 L tanks in which seawater was replaced daily with pumped seawater from Brest bay (dissolved oxygen concentration $> 7.5 \text{ mg. L}^{-1}$, salinity 35%) and filtered at $1 \mu\text{m}$. Seawater temperature was progressively incremented by one degree Celsius per day until reaching 19°C and animals were maintained at this temperature during one week before experimentation.

Two virulent strains of *Vibrio harveyi* were used in this study. The first ORM4 strain had been isolated from diseased abalone *H. tuberculata* in Normandy, France, during an episode of massive mortalities in 1999 (Nicolas *et al.*, 2002.), and the second strain is a green fluorescent protein-tagged (GFP) and kanamycin resistant bacteria constructed from the ORM4 strain by Travers *et al.* (Travers *et al.*, 2008a). Bacteria were grown in Luria-Bertani Broth (LB, Sigma) supplemented with salt (20 g. L^{-1} , f.c) –LBS- in a temperature controlled shaker, at 28°C for 16 hours before challenge.

2.2. Experiment 1: effect of contact time on vibriosis mortalities

Five triplicate groups with 15 mature abalone each (2.5 years old) were challenged with a suspension of *V. harveyi* ORM4 strain, at the final concentration of 10^5 CFU.mL^{-1} per tank during one hour, 3h, 6h, 9h and 24h respectively. A control group, not exposed to bacteria, has been also included. Daily dead abalone were counted and removed until mortality stabilization. Comparison of mortality curves between different challenge intervals was performed with a Kaplan-Meier analysis followed by a log-rank test (Kaplan and Meier, 1958).

2.3. Experiment 2: microscopic observations

Two non-infected abalone were removed from their shell and visualized using a stereomicroscope LUMAR (Carl Zeiss Group, Oberkochen, Germany) to identify autofluorescent organs prior to adding a $100 \mu\text{L}$ GFP-*V. harveyi* ORM4 strain suspension, at a

concentration of 10^5 bacteria/mL, at 19°C. Microscopic observation was immediately done to detect a putative preferential tropism of *V. harveyi* for one or several organs.

2.4. Experiment 3: quantification

2.4.1. Challenge and animal sampling

Sixty mature abalone (2 years old, 34.6 mm \pm 1.9) were placed in 6 tanks, each had 10 animals, and were separated into two equivalent sets: a first set had animals challenged with the GFP strain at a final concentration of 10^8 CFU.mL⁻¹ (Travers *et al.*, 2008a), and a second set had animals immersed in filtered sea water (control group). A higher bacteria concentration was used in this experiment to avoid inter-individual variability in response to the pathogen virulence. Ten animals were removed from the tanks prior to infection and were used as *t0* samples. Five control and five challenged individuals were sampled after one hour, 3h, 6h, 9h and 24h post-infection.

2.4.2. Hemolymph and tissue sampling

The hemolymph of each abalone was collected from the pedal sinus using a 2.5 mL sterile syringe mounted with a 23-gauge needle. One milliliter of hemolymph was reserved for bacterial quantification by plating then kept on ice until use, and one milliliter was saved for quantitative PCR (Q-PCR) analysis and stored at -20°C until DNA extraction. After hemolymph sampling, all animals were dissected under sterile conditions. The two gills coupled with the hypobranchial gland, the central portion of the foot-muscle, a section of the gonad-digestive gland, mouth and *epipodia* were extracted and conserved. All organs were cut into two equal portions: the first one was immediately washed in an ethanol 70% bath to remove non-penetrated bacteria then rinsed with sterile seawater, and the second portion was briefly plunged in a sterile seawater bath. Each organ piece was weighted and homogenized in 1 mL sterile seawater using a mechanical disruptor. Two hundred microliters of homogenate were reserved for quantification by plating and kept on ice until use, and 800 μ L were stored at -20°C until DNA extraction.

2.4.3. Bacterial quantification by plating

The bacterial quantification was done by plating on samples of abalone kept in contact with *V. harveyi* during one hour, 3h and 6h. Two series of ten-fold dilutions (10^{-1} and 10^{-2}) of homogenate tissues and hemolymph samples were made with sterile seawater. One hundred microliters of pure and diluted homogenates were plated onto LBS agar dishes containing $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kanamycin, to ensure GFP-bacteria selection. Dishes were incubated overnight at 28°C and fluorescent colonies isolated under UV light were counted. Each bacterial quantity was reported to 100 mg of tissue (density) or one mL of hemolymph (concentration).

2.4.4. Bacterial quantification by quantitative PCR

2.4.4.1. DNA extraction procedure

Five hundred microliters of pure hemolymph or homogenates of non-treated tissue with ethanol were diluted in 500 μL of extract salted buffer (100 mM TrisHCl, 100 mM NaCl and 50 mM EDTA pH8). Total DNA were extracted using a traditional phenol/chloroform/isoamyl alcohol method (Sambrook and Russell, 2001), after treatment with RNase A (10 mg/mL), lysozyme (10 mg/mL), 10% SDS (v/v), 10% Sarkosyl (v/v), and Proteinase K (25 mg/mL). Finally, DNA was suspended in 50 μL of DNase free water. Concentration and quality of the nucleic acids were determined using a spectrometer Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher scientific, USA).

The standard samples used for Q-PCR were obtained after DNA extraction from 500 μL of hemolymph or 100 mg organ homogenates, dissected from non-infected abalone and supplemented with 10-fold cascade dilutions of *V. harveyi* (10^8 CFU to 0). Viable bacteria were counted by plating and optical microscopy.

2.4.4.2. Quantitative PCR conditions and analysis

Q-PCR measures were taken using a 7500 Fast Real-Time PCR System instrument and a TaqMan® Universal Master Mix (Applied biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Amplification was done with *V. harveyi* tox-R gene specific primers: Forward CCA-CTG-CTG-AGA-CAA-AAG-CA and Reverse GTG-ATT-CTG-CAG-GGT-TGG-TT. Fluorescent visualization of amplification was done using a tox-R probe dually

labeled with a 5' reporter dye Texas Red and a downstream 3' quencher dye BHQ-2 (Schikorski *et al.*, in press). After optimization of primer and TaqMan® probe concentrations, each reaction was run in duplicates, for a final volume of 20 µL with 4 µL of DNA sample, 1X concentration of TaqMan master mix, 300 nm of each primer and 200 nm of probe. Reactions were initiated after activation of the Thermo-Start DNA polymerase during 10 minutes at 95°C followed by 45 amplification cycles (denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 1 min). Threshold cycle (*Ct*) is defined as the first PCR cycle in which probe reporter fluorescence is detectable above a baseline signal, and is inversely proportional to the logarithm of the initial bacteria density or concentration. Thus, *Ct* values, obtained for each sample using 7500 software v2.0.3, were compared with the standard curves to determine the initial *V. harveyi* density or concentration.

The sensitivity of the amplification was estimated for each abalone organ from 3 separated Q-PCR assays. The primer efficiency was determined by the slope of the standard curves using the method described by Yuan *et al.*: $E = 10^{[-1 / \text{slope}]}$ (Yuan *et al.*, 2006).

The influence of time on bacterial density or concentration was assessed for the different organs using a non-parametric Wilcoxon test. Differences of bacterial concentrations or densities between two infection intervals were detected by a Wilcoxon signed-rank test (Wilcoxon, 1945). Statistic tests were done using JMP 10.0.0 software (SAS Institute Inc.).

3. Results

3.1. Effect of contact time on abalone mortality

European abalone mortality due to vibriosis was assessed during a 12 day period after different contact times with *V. harveyi* (Figure 1). The cumulated mortality rate increased while the lethal time period (LT50), where 50% of abalone are dead, decreased throughout the different contact times (Table 1). Kaplan Meier analyses inferred that mortality curves are different between 1h vs 6h ($p = 0.0114$) and between 6h vs 24h of contact ($p = 0.042$). A contact of one hour with *V. harveyi* was sufficient to provoke mortality. Abalone mortality surpassed 75% after a contact of 6h and reached 80% after a contact of 24h. No mortality was reported in control groups.

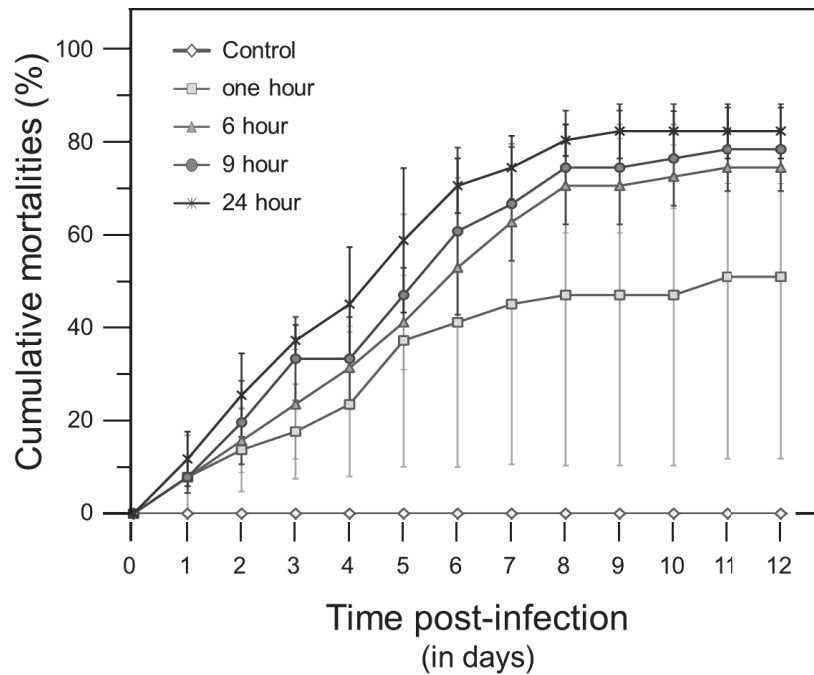


Figure 1: Influence of contact time with *Vibrio harveyi* on mortality kinetic in the European abalone.

Animals were exposed to a 10^5 bacteria/mL challenge by immersion during one hour, 6h, 9h and 24h at 19°C. Results correspond to the mean from 3 experimental replicates of 15 abalone per replicate and per tank. Bars indicate standard error rates. Control animals were only immersed in filtered seawater. Comparison of mortality curves was performed with a Kaplan-Meier analysis (Kaplan and Meier, 1958).

3.2. Portal of entry

3.2.1. Microscopic observations

Immediately after contact between the GFP-*V. harveyi* strain and abalone, fluorescent bacteria appeared between gill filaments (Figure 2B). After few hours, fluorescent bacteria were aggregated on the epithelial and mucosal area between gills and the hypobranchial gland (Figure 2C).

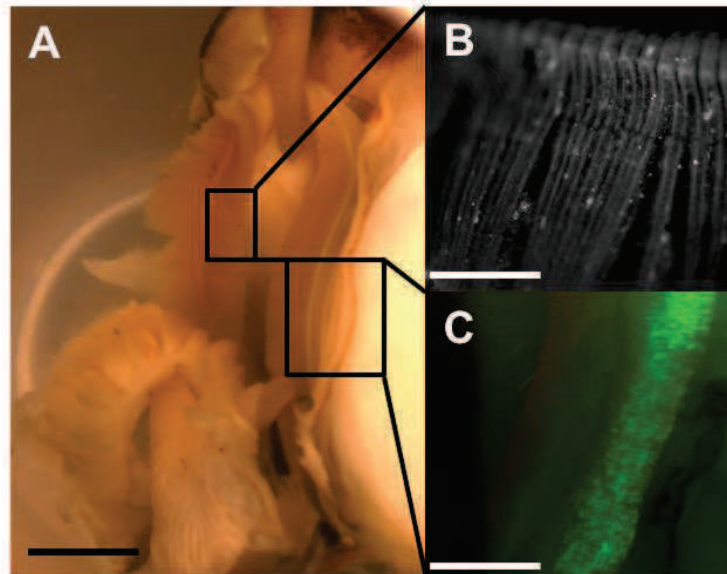


Figure 2: Microscopic observations taken on European abalone organs and fluorescent bacteria, immediately after the contact with GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain ORM4.

Observations were made using a stereomicroscope LUMAR (Carl Zeiss Group, Oberkochen, Germany) under UV light conditions.

A: anatomy of European abalone gills, bar correspond to 5mm; B: observation of fluorescent bacteria between gill filaments, bar correspond to 1mm; C: observation of a fluorescent bacteria aggregation epithelial area between gills and the hypobranchial gland after 6h of contact, bar correspond to 4mm.

3.2.2. Portal of entry and targeted organs

Quantification by plating revealed that *V. harveyi* densities increased exponentially in all organs during the first few hours after contact and throughout the different contact times. The density of adhered GFP-bacteria was respectively 5 and 12 fold higher on the surface of gills than on the surface of the digestive gland and on the surface of foot-muscle after 6h of contact (Figure 3A). Penetrated bacteria were also 10 fold more numerous in gills than in the digestive gland after 6h of contact (Figure 3B).

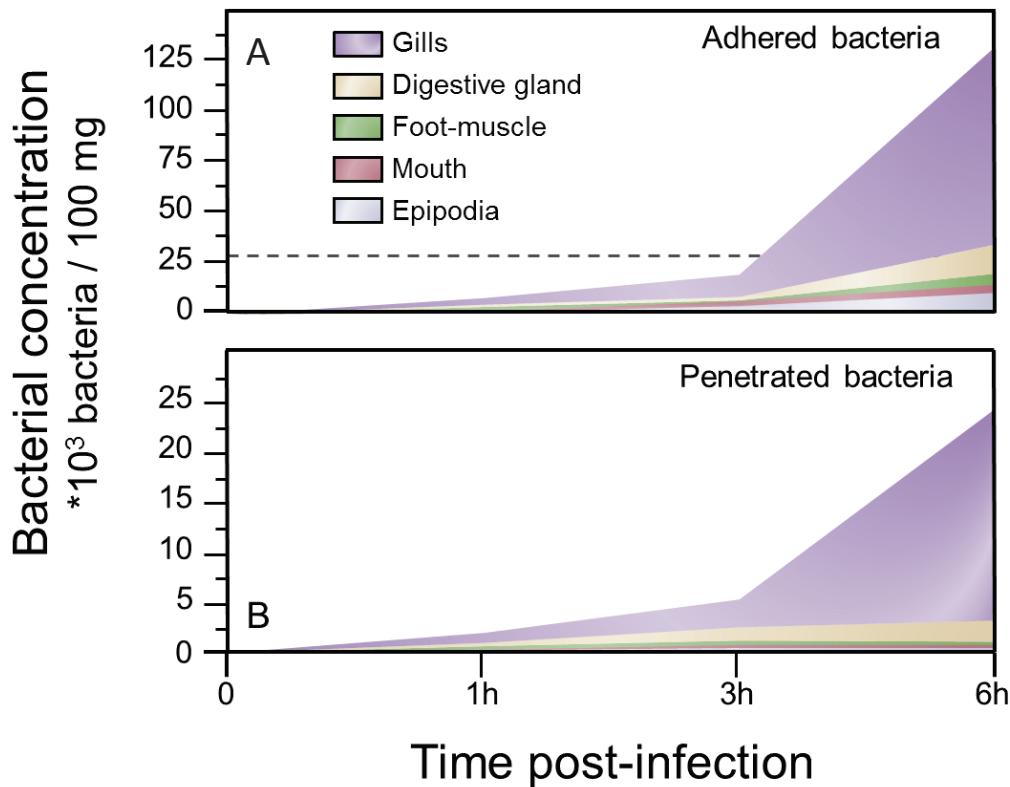


Figure 3: *Vibrio harveyi* densities in European abalone organs during contact.

Densities were expressed in number of bacteria per 100 mg of tissue. Quantification of GFP-tagged and kanamycin resistant *V. harveyi* ORM4 strain was done after tissue homogenate plating on kanamycin-LBS agar dishes after overnight incubation at 28°C.

A: quantification in non-treated organs with ethanol – adhered and penetrated bacteria ; B: quantification in briefly washed organs with ethanol – penetrated bacteria.

3.3. Efficiency and Q-PCR sensitivity for *V. harveyi* quantification

Sensitivity and efficiency of *V. harveyi* Q-PCR quantification via ToxR gene amplification were assessed in gills, digestive gland, foot-muscle and hemolymph (Figure 4). The sensitivity threshold was fixed at 10^2 bacteria/100 mg of tissue for gills, 10^3 bacteria/100 mg for digestive gland, 10^1 bacteria/100 mg for foot-muscle and 10^2 bacteria/mL for hemolymph. The equation of regression line was then used to calculate bacteria concentration or density from obtained Q-PCR data. The average amplification efficiency ranged between 95% in gills, 84% in digestive gland, and 105% in muscle and hemolymph.

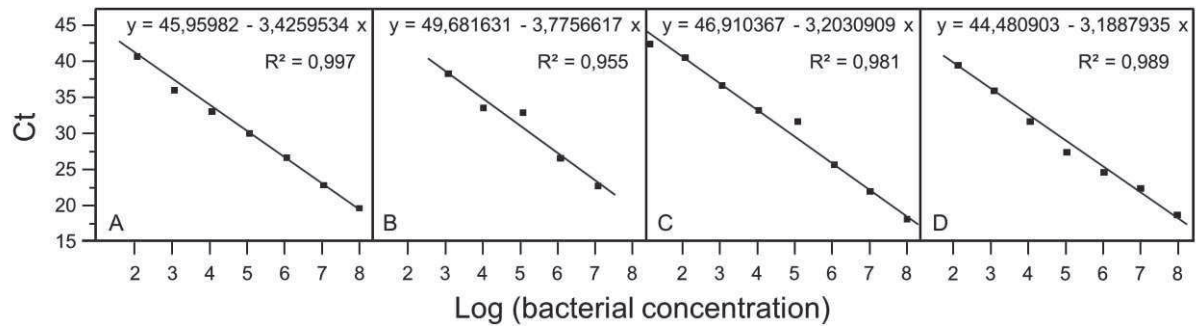


Figure 4: *Vibrio harveyi* detection done by quantitative PCR in European abalone tissue and hemolymph.

Standard densities or concentrations (bacteria number per 100 mg of tissue or mL of hemolymph) were estimated by optical density, plating and microscopic enumeration. Cycle thresholds (*Ct*) were provided by the Q-PCR supplied software, and the average of three separated assays was visualized on the graphs for each separate tissue. The mathematical equation and the R² index of simple regression between *Ct* and standard concentrations were indicated for each tissue.

A: density estimation in gills; B: in digestive gland; C: in foot-muscle; D: concentration estimation in hemolymph.

3.4. Infection kinetic

V. harveyi concentration depended on time of contact in all abalone compartments ($p < 0.01$ for the Wilcoxon test). In hemolymph, bacterial concentration increased with contact time, except for Q-PCR quantification between 3h and 9h of contact (Figure 5, table 2). In gills, the density of adhered and penetrated vibrios also increased significantly with time until 6h of contact, for both of quantification method used (Table 2). Moreover, penetrated bacteria in gills surpassed 10^3 CFU/ 100 mg after the first hour of contact, while penetrated bacteria in the digestive gland and muscle did not reach the 10^2 CFU/ 100 mg threshold until 6h of contact (Figure 5). For the digestive gland, quantification by plating revealed a significant increase of density either for adhered or penetrated bacteria during infection. However, Q-PCR measures showed a stabilization of *V. harveyi* densities in the digestive gland after one hour, except the difference detected between 3h and 6h of contact (Figure 5, table 2). In foot-muscle, *V. harveyi* density measured by plating increased significantly during the first hour and after 6h of contact (Figure 5, table 2). Meanwhile, Q-PCR analysis in foot-muscle showed significant differences between controls and infected animals until 9h of contact (Table 2).

For the majority of the measures, bacterial count by Q-PCR analysis was slightly higher than plating count. No bacteria were counted either in t_0 samples or in controls, by plating or by Q-PCR analysis.

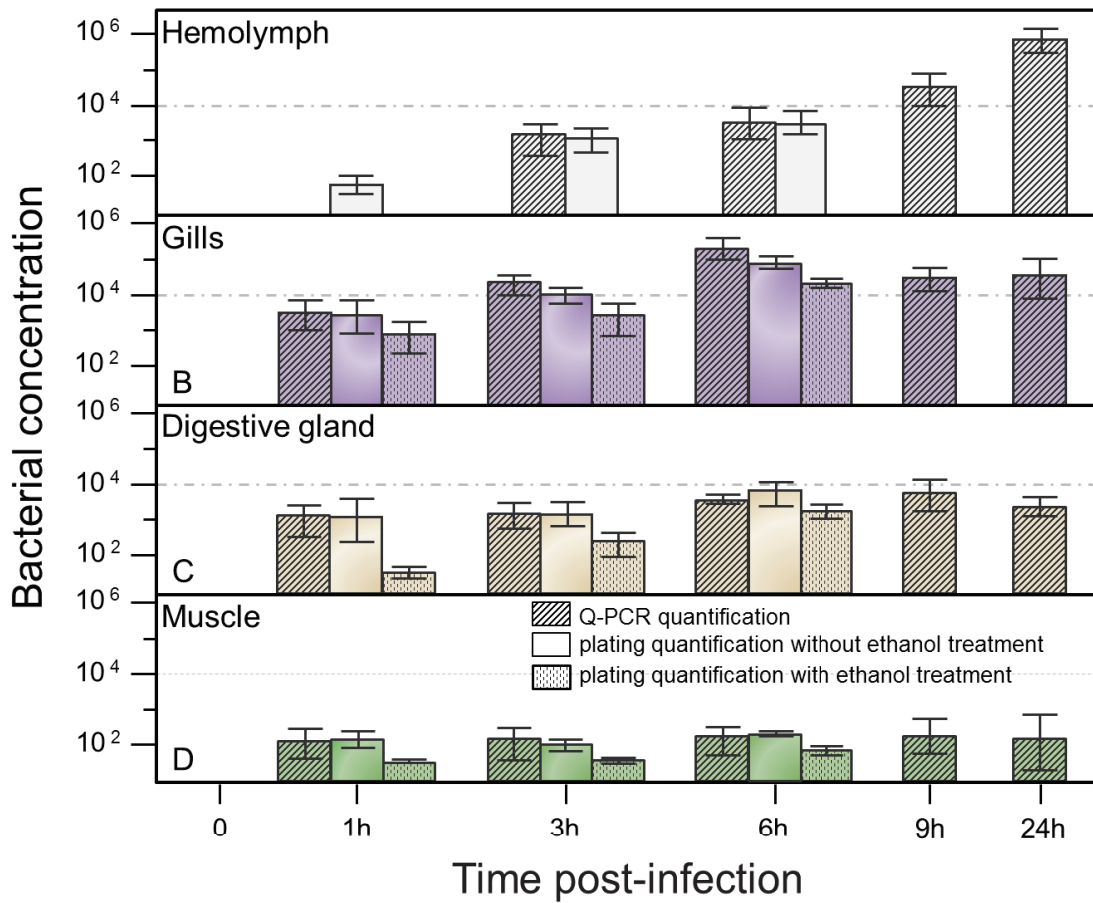


Figure 5: Dynamic infection of *Vibrio harveyi* in European abalone tissues.

Densities or concentrations (bacteria count per 100 mg of tissue or mL of hemolymph) were estimated in hemolymph (A), gills (B), digestive gland (C) and foot-muscle (D), during the first 24h of contact. Results are given in averaged concentrations or densities of five biological replicates, estimated by plating on kanamycin-LBS agar dishes from organs treated or not treated with ethanol, and by quantitative PCR using specific primers and Taqman probe. Bars indicate standard errors. No bacterium was detected in *t0* samples, or in control individuals immersed in filtered-seawater without *V. harveyi* suspension.

4. Discussion

Time of contact with the pathogen *V. harveyi* influenced mortality rate and infection kinetic in European abalone (Figure 1). Immediately after contact, a large number of bacteria went straight to the gills and hypobranchial gland (Figure 2). Moreover, at 6h post-contact, the density of *V. harveyi* was at least 5-fold greater in gills and in the hypobranchial gland than in other tissues (Figure 3). Finally, *V. harveyi* appeared in a significantly concentration in hemolymph 3 hours post-contact (Figure 4).

Our results showed that the duration of contact between *V. harveyi* and the European abalone was correlated with mortality rate. Moreover, one hour of exposure was sufficient to induce mortality. This observation suggests that *V. harveyi* is able to adhere then penetrate abalone tissues during the first hour of contact. The relative rapidity of adherence and penetration in the host was previously described for most *Vibrio* species and may contribute to their virulence. For example, in the association between the luminous bacterium *V. fischeri* and the sepiolid squid *Euprymna scolopes*, Lamarcq and Mc Fall-Ngai, showed that the symbiont exhibit some epithelium changes in order to penetrate tissues after few seconds (Lamarcq and McFall-Ngai, 1998). In the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*, the study of *Vibrio sp* infection dynamics after oral inoculation showed that the pathogen can be detected in stomach and hemolymph after 3h, and in all other sampled organs after 6h (Delapena *et al.*, 1995).

The quantification of adhered or penetrated *V. harveyi* in different tissues by plating showed a high density of *V. harveyi* on the surface then within gills filaments, and the hypobranchial gland at one hour post-contact. Microscopic observation confirmed a tropism of *V. harveyi* for the epithelial and mucosal region situated between gills and the hypobranchial gland in the European abalone. Previous studies showed that gills seem to be an ideal place of adhesion, hence a relevant entrance of *Vibrio* pathogens in marine mollusks. In the case of the challenge with a GFP virulent strain of *V. parahaemolyticus*, the density of bacteria was maintained in gills of oysters *Tiostrea chilensis* during 48h post-contact (Cabello *et al.*, 2005). Sawabe *et al.* also revealed a tropism of a GFP virulent strain of *V. harveyi* for gills in the abalone *H. discus hannai* (Sawabe *et al.*, 2007a). Our results add another degree of clarification and functional complexity regarding the observations done by Travers *et al.*, who visualized an accumulation of *V. harveyi* on the surface of gills in infected animals (Travers *et al.*, 2008a). This region may constitute the portal of entry of *V. harveyi* in the European abalone. The proximity of this targeted region with the heart, and the anterior aorta may allow the pathogen to quickly invade the circulatory system of the European abalone (Crofts, 1929; Manganaro *et al.*, 2012).

This hypothesis of an entry route of *V. harveyi* via the epithelial region between gills and the hypobranchial gland has to be confirmed using some additional advanced electron microscopy techniques.

In the current study, we have used and tested a Taqman® probe developed by Shirkoski *et al.* (in prep.) for a Q-PCR assay of *V. harveyi* in hemolymph and tissues of European abalone. Measures done with Taqman PCRs following a cascade dilutions scheme, using pure cultured samples of abalone tissues, showed an excellent linear correlation and have proven to be a powerful and sensitive technique for *V. harveyi* quantification. TaqMan Q-PCRs have been previously showing to be useful in the detection of pathogenic strains of *V. vulnificus*, *V. parahemolyticus* and *V. aestuarianus* in marine mollusks (Panicker and Bej, 2005; Gordon *et al.*, 2008; Blanco-Abad *et al.*, 2009; Saulnier *et al.*, 2009; Baker-Austin *et al.*, 2010). Nevertheless, a low extrapolation of bacteria count by Q-PCR was widely observed in our measures compared to the plating method. This observation may be due to the quantification of dead or uncultivable bacteria by Q-PCR.

Quantification of adhered and penetrated *V. harveyi* in abalone organs (i.e., gills-hypobranchial gland, the digestive gland and the foot-muscle), and hemolymph, helped us understand its infection dynamics. After one hour of contact, *V. harveyi* was already detected by plating and by Q-PCR on the surface of all the abalone tissue analyzed, hence inferring that *V. harveyi* is able to adhere to abalone during the first hour of contact. The concentration of *V. harveyi* in the hemolymph increased progressively between 3h and 24h post-contact. This observation suggests that the concentration of *V. harveyi* in hemolymph may be a proxy to the development of infection in the European abalone, and that the stage of multiplication and invasion may occur during the first hours post-contact. The relative rapidity of *Vibrio* invasion was also observed in the oyster *Crassostrea gigas* in which virulent strains of *V. splendidus* and *V. aestuarianus* were detected by Q-PCR in hemolymph after 2h of contact, and concentrations of both pathogens were maximal after 6h (De Decker and Saulnier, 2011). Between all the organs analyzed here, the density of *V. harveyi* increased significantly with the contact time in gills in which the density was maximal after 6h of contact. This increase in pathogen density may be due to a local multiplication of *V. harveyi* on the surface of gills and the hypobranchial gland, which supports the hypothesis of a putative portal of entry of *V. harveyi* in this region.

In conclusion, *V. harveyi* seems to have the capacity to adhere and penetrate the European abalone during the first hours of contact. We hypothesize that the portal of entry of *V. harveyi*

is the epithelial region situated between the gills and the hypobranchial gland. Invasion of *V. harveyi* in the abalone organs is fast and progressive during the first hours of contact and may be characterized by quantification in the hemolymph. Further observations need to be conducted to verify the putative portal of entry of *V. harveyi* in the European abalone and localize it precisely. This study showed the importance of pathogen concentration measures during the first hours of contact with the host, to improve our knowledge and understand the infection dynamics of *Vibrio* pathogen in marine mollusks.

Tables

Table 1: Percentages of cumulated mortalities in European abalone after 12 days of infection, and lethal time during which 50% of abalone stock were dead (LT50), reported for each contact time with *V. harveyi*. Results correspond to the means of 3 experiment replicates of 15 animals.

Time contact	% of mortalities after 12 days of infection	LT50 *
1h	57.8	6.8
6h	84.4	5.3
9h	88.9	4.5
24h	93.3	3.7

* lethal time in days.

Table 2: Statistical significance of *V. harveyi* concentrations or densities in European abalone organs during infection time. Differences were detected by Wilcoxon signed-rank test (Wilcoxon, 1945). An asterisk (*) indicates a statistically significant difference at $p < 0.1$, two asterisks (**) mean that the differences are statistically significant at $p < 0.05$.

Quantification method		Plating without ethanol treatment			Q-PCR					Plating with ethanol treatment		
Organ	Time ^a	1	3	6	1	3	6	9	24	1	3	6
HL ^b	0	**	**	**	Nd ^c	**	**	**	**			
	1		**	**		**	**	**	**			
	3			**			**	ns	**			
	6							ns	**			
	9								**			
Gills	0	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	1		**	**		**	**	**	**		ns	**
	3			**			**	**	**			**
	6							*	ns			
	9								ns			
Digestive gland	0	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	1		ns	**		ns	ns	ns	ns		**	**
	3			**			*	ns	ns			**
	6							ns	ns			
	9								ns			
Muscle	0	**	**	**	**	**	**	**	ns	**	**	**
	1		ns	ns		ns	ns	ns	ns		ns	**
	3			**			ns	ns	ns			*
	6							ns	ns			
	9								ns			

^a infection time in days.

^b hemolymph.

^c not detected.

2. Résultats complémentaires : Température et virulence de *V. harveyi*

Les infections expérimentales par injection de culture de la souche ORM4 et de la souche LMG 7890 à 16 et 19°C, chez des ormeaux européens, ont permis de mettre en évidence un effet de la souche considérée, des doses injectées et de la température sur la cinétique de mortalités et le pourcentage de mortalités cumulées après 8 jours d'inoculation (Fig. 37). Ces observations sont corroborées par l'analyse de Kaplan-Meier couplée à un test log-rank, qui révèle une différence significative entre toutes les courbes de mortalités présentées ci-dessous, à l'exception de la courbe relative aux mortalités des individus témoins injectés avec de l'eau de mer stérile filtrée, et des individus injectés par une dose de 10^3 bactéries de la souche LMG 7890 à 16°C.

Ainsi, pour une souche donnée, le début des mortalités est généralement d'autant plus précoce que la dose injectée est importante (Fig. 38), et le temps auquel 50% du lot d'ormeaux considérés par condition d'injection a subi des mortalités (« lethal time » ou LT50) est plus important à 16°C qu'à 19°C.

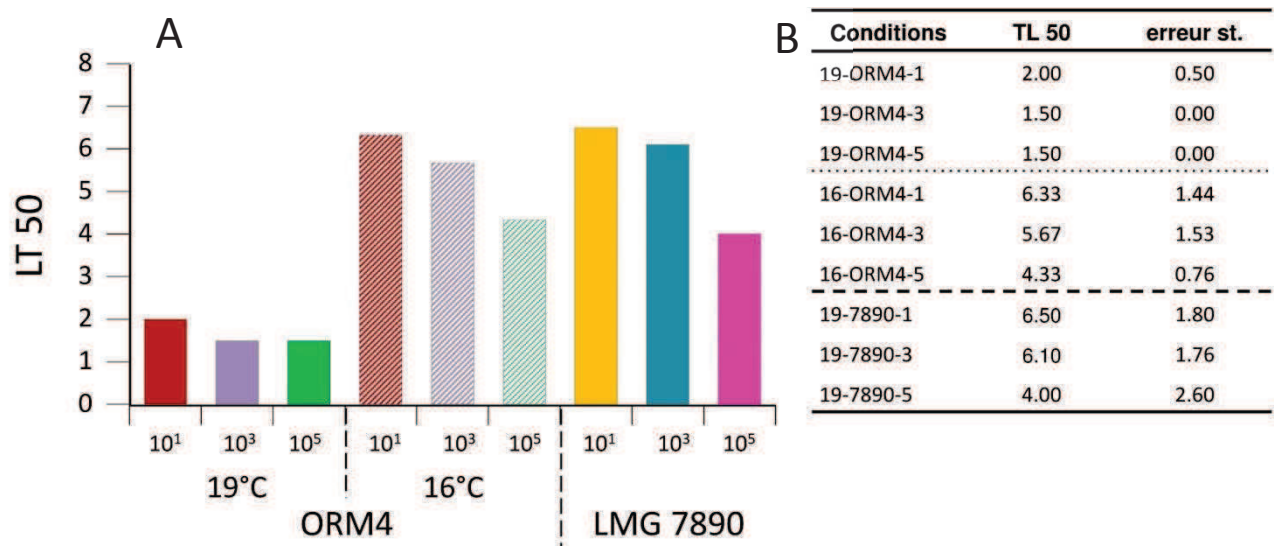


Figure 38 : « Lethal times » (LT50) estimés lors d'injection de la souche ORM4 à 16 et 19°C ou de la souche LMG 7890 à 19°C de *V. harveyi* chez des ormeaux européens.

A : LT50 estimées en fonction de la souche considérée, de la température et de la dose injectée ; B : Moyennes et erreurs standard des LT50 estimées pour 3 réplicats de 10 individus par condition.

Pour une température considérée, le pourcentage de mortalités cumulées est globalement corrélé positivement à la dose de vibrions injectée (Fig. 27), à l'exception des injections d'ORM4 à 19°C qui induisent entre 90 et 100% de mortalités indépendamment de la dose injectée.

Pour une dose déterminée, le pourcentage de mortalités cumulées est plus élevé pour la souche ORM4 que pour la souche LGM 7890, injectées à 19°C, et également plus élevé à 19°C qu'à 16°C au sein de la même souche injectée (Fig. 27).

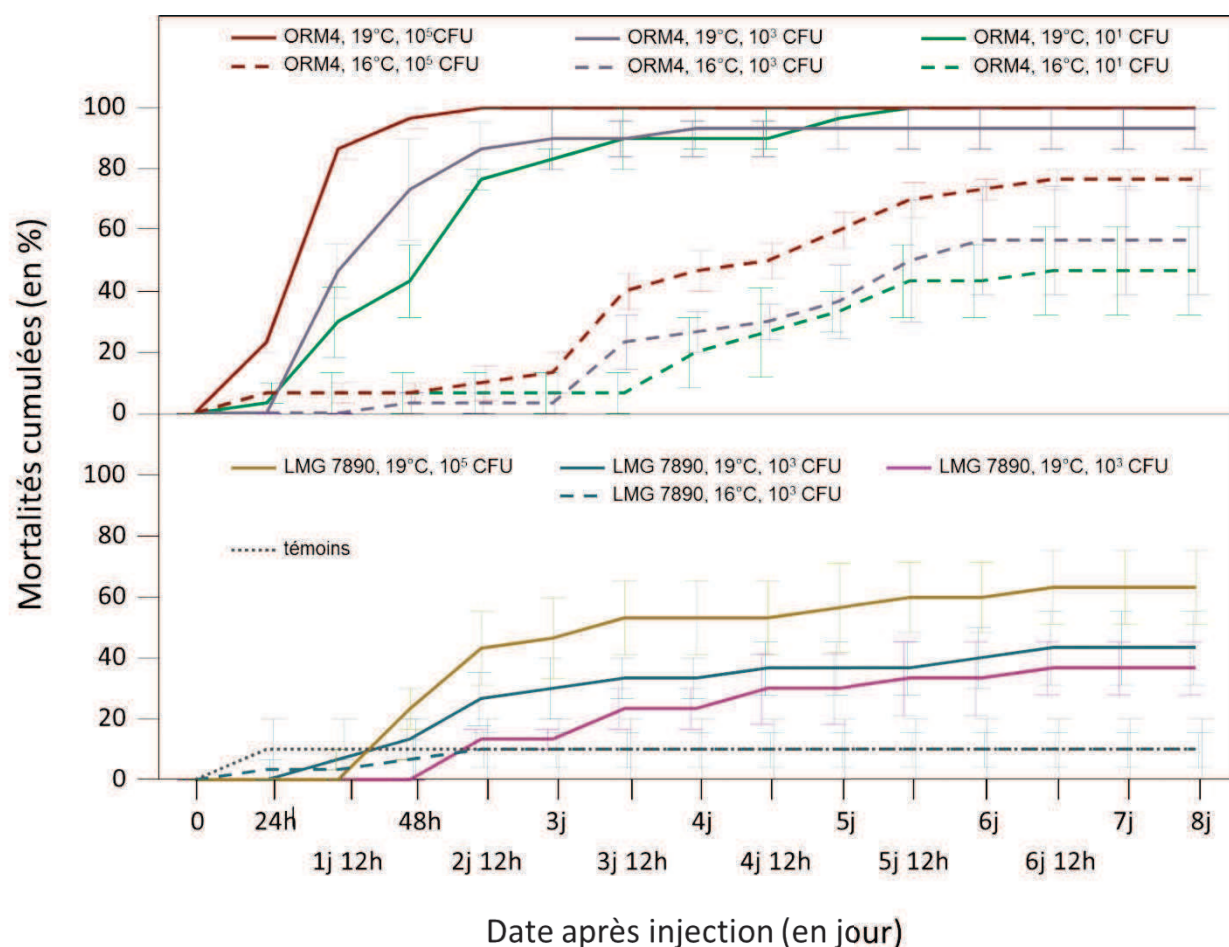


Figure 37 : Cinétique de mortalités d'ormeaux européens soumis à des injections à doses croissantes de suspensions bactériennes de la souche ORM4 ou de la souche LMG 7890 de *V. harveyi*.

La moyenne des mortalités et l'erreur standard de trois réplicats de 10 individus par condition ont été estimées à chaque temps d'observation.

3. Résultats complémentaires : Facteurs de virulence de la souche ORM4, pathogène de l'ormeau européen

Le séquençage du génome complet des souches ORM4 et LMG 7890 a permis de révéler l'existence 1/ de gènes potentiellement reliés à la virulence de ces souches, et 2/ de gènes propres à la souche ORM4, i.e. non présents au sein du génome de la souche LMG 7890. L'analyse préliminaire et partielle du génome de la souche ORM4, réalisée à l'aide du site du génoscope (<https://www.genoscope.cns.fr>, données privées), a permis de révéler l'existence de 5483 régions codantes. Les gènes potentiellement associés à ces régions sont impliqués dans la synthèse de divers types protéiques (enzyme, transporteur, effecteur, etc...) qui regroupent des constituants et effecteurs de différents compartiments cellulaires (Tableaux 10A et B).

Tableaux 10A et B : Rôle des gènes identifiés au sein du génome de la souche ORM4 de *V. harveyi*, pathogène de l'ormeau européen, et compartimentation cellulaire de ces gènes. Le nombre de gènes associés à chaque rôle ou compartiment cellulaire et leur pourcentage au sein du génome complet sont indiqués.

A			B		
Rôle	Nombre de gènes	Pourcentage au sein du génome	Compartiment cellulaire	Nombre de gènes	Pourcentage au sein du génome
ORF avec fonction non connue	2205	40.22%	Non classées	1571	28.65%
Non classés	1566	28.56%	Périplasmiques	62	1.13%
Enzyme	752	13.72%	Associées à la membrane externe	8	0.15%
Enzyme potentielle	226	4.12%	Protéines de la membrane externe	28	0.51%
Transporteur	192	3.50%	Associées à la membrane interne	30	0.55%
Transporteur potentiel	65	1.19%	Protéines de la membrane interne	254	4.63%
Effecteur	101	1.84%	Cytoplasmiques	705	12.86%
Effecteur potentiel	30	0.55%	Membranaires	43	0.78%
Régulateur	99	1.81%	Sécrétées	8	0.15%
Régulateur potentiel	43	0.78%	Non connues	2774	50.59%
Structure	70	1.28%			
Structure potentielle	4	0.07%			
Pont ionique	46	0.84%			
Pont ionique potentiel	8	0.15%			
Composant membranaire	9	0.16%			
Composant membranaire potentiel	13	0.24%			
Récepteur	1	0.02%			
Récepteur potentiel	5	0.09%			
Origine extrachromosomal	9	0.16%			
Processus cellulaire	34	0.62%			
Lipoprotéine	5	0.09%			

Plusieurs de ces séquences codantes pourraient être impliquées dans la virulence de la souche ORM4 de *V. harveyi* et intervenir dans les mécanismes suivants (Fig. 39):

- Le processus d'adhésion cellulaire :
 - métabolisme de la chitine : chitinases et « chitin-binding protein »,
 - constitution et fonctionnement des systèmes flagellaires polaires et latéraux,
 - constitution et fonctionnement des *pili*,
 - chimiotactisme dont les protéines CHE impliquées dans la régulation du mouvement et de l'orientation des flagelles,
 - des protéines et enzymes de la production de polysaccharides et plus spécifiquement de l'agencement de la capsule bactérienne et de l'architecture du biofilm,
 - une protéine portant le domaine protéique particulier VCBS ;
- la production de protéines extracellulaires dont les hémolysines, lipases, protéases et métalloprotéases, toxines et bactériocine, et collagénases ;
- la constitution des systèmes de sécrétion de type II, III et V ;
- la production de sidérophores notamment de la vibrioferrine, caractéristique du genre *Vibrio* ;
- et la production d'autres protéines de virulence de type VirA ou protéine associée à la virulence E.

Certaines séquences codantes appartenant à ces catégories ne sont pas présentes chez la souche non pathogène de référence LMG 7890, leur pourcentage au sein du génome est estimé à 9,50% (Tableau 11). Parmi ces séquences propres à la souche ORM4, figurent des gènes associés au processus d'adhésion, à des toxines dont une bactériocine et à systèmes toxine/anti-toxine, à deux protéases et à une métalloprotéase, à une lipase, à quatre gènes associés à la constitution ou au fonctionnement de système de sécrétion de type III, et aux protéines VirA et « virulence-associated protein E ».

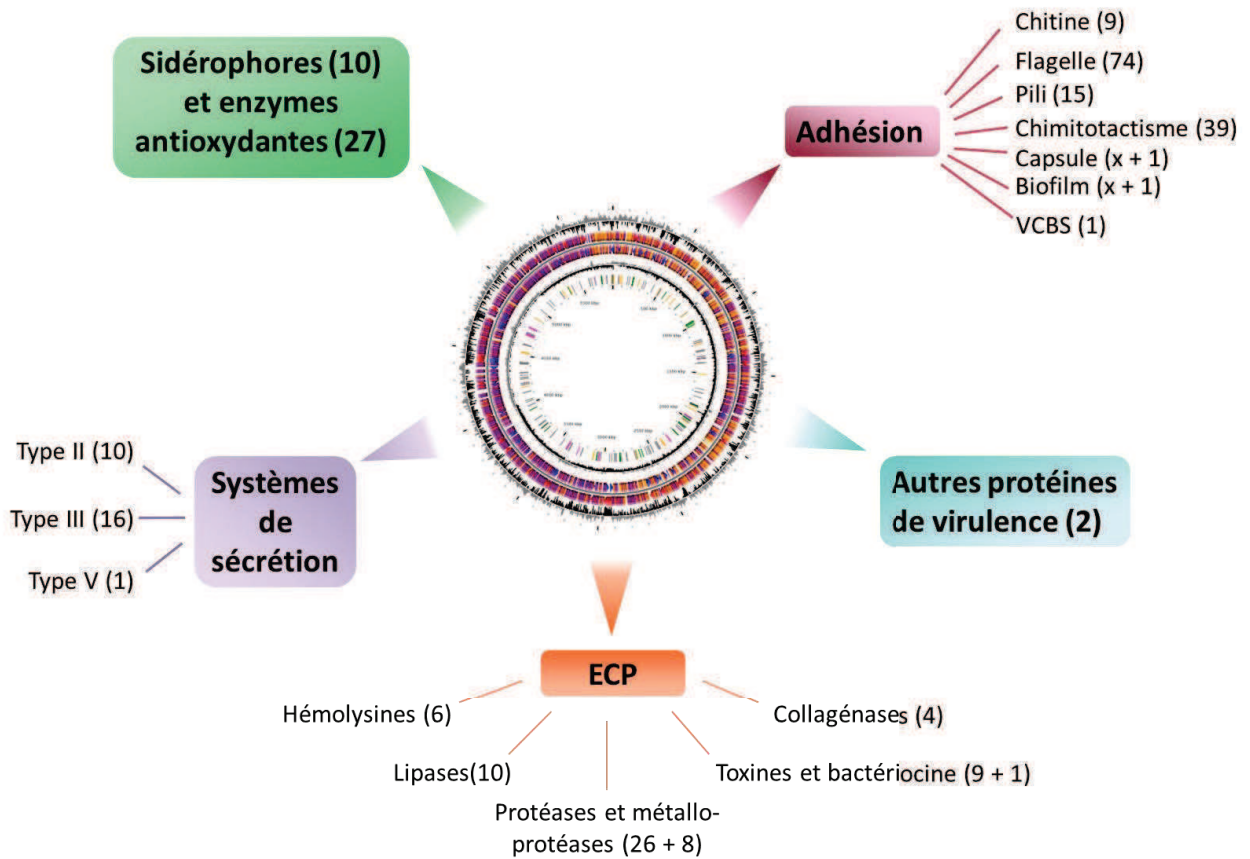


Figure 39 : Protéines impliquées dans la virulence de la souche ORM4 de *V. harveyi*, pathogène de l'ormeau européen.

Ces protéines ont été décelées par homologies de séquences entre les régions codantes de cette souche et celles d'autres espèces référencées dans le site MaGe du génoscope. Le génome de la souche ORM4 est représenté au centre de la figure. Le nombre de gènes identifiés intervenant dans chaque fonction est indiqué en parenthèse. ECP : protéines extracellulaires.

Tableau 11 : Exemples de séquences codantes et protéines potentielles associées présentes au sein du génome de la souche ORM4 de *V. harveyi*, pathogène de l'ormeau européen, et absentes au sein de la souche LMG 7890 de *V. harveyi*, souche non pathogène de référence dans cette étude. La dénomination du gène au sein du génome et sa protéine associée sont indiquées dans le tableau et sont reliés à la fonction de cette protéine, l'espèce qui présente une séquence génomique ou peptidique homologue et le pourcentage d'identité, i.e. de similarité entre ces séquences.

gène	protéine associée	fonction	espèce homologue	identité
HORM4v2_490025	métabolisme de la chitine	Phospho-beta-glucosidase	Listeria innocua FSL S4-378	72.5
HORM4v2_180038	constitution du flagelle	flagellin	Vibrio harveyi ATCC BAA-1116	97.61
HORM4v2_760004	chimiotactisme	methyl-accepting chemotaxis protein hemolysin secretion protein HylB	Vibrio vulnificus MO6-24/O	74.4
HORM4v2_730046	toxine	rTX toxin	Vibrio sp EX25	50.63
		Type V secretory pathway	Vibrio tapetis LP2	44.44
HORM4v2_740001	toxine	rTX toxin	Vibrio sp EX25	70.66
HORM4v2_890009	système toxine/antitoxine	Doc toxin	Vibrio vulnificus MO6-24/O	98.04
HORM4v2_890010	système toxine/antitoxine	Phd antitoxin	Vibrio vulnificus MO6-24/O	98.92
HORM4v2_90053	toxine	Putative pyocin S3 immunity protein	Pseudomonas aeruginosa	36
HORM4v2_90054	toxine	S-type Pyocin family	Vibrio parahaemolyticus Peru-466	81.8
HORM4v2_990008	toxine	ADP-ribosyltransferase toxin aexT (Exoenzyme T)	Photobacterium damsela subsp. damsela CIP 102761	86.19
		Outer membrane virulence protein YopE	Yersinia enterocolitica	33.17
HORM4v2_600001	système toxine/antitoxine	hypothetical relE protein	Vibrio furnissii NCTC 11218	100
HORM4v2_600002		protein StbD	Vibrio furnissii NCTC 11218	100
HORM4v2_970001	bactériocine	Peptidase C39, bacteriocin processing	Vibrio sp. AND4	82.11
HORM4v2_660103	protéase/système de sécrétion de type III	cysteine protease domain, YopT-type protein	Vibrio harveyi HY01	90.39
HORM4v2_870015	protéase	Heat shock protein/serine protease	Campylobacter jejuni	38.71
HORM4v2_830033	métalloprotéase potentielle	protease	Vibrio nigripulchritudo SFn1	32.8
HORM4v2_40060	lipase	Patatin family protein	Vibrio cholerae MJ-1236	64.24
HORM4v2_240136	système de sécrétion de type III	type III secretion protein PcrV	Vibrio harveyi ATCC BAA-1116	70.13
			Pseudomonas aeruginosa PAO	56.72
HORM4v2_600120	système de sécrétion de type III	yopH targeting protein	Vibrio sp. AND4	49.64
		AopH chaperone SycH	Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449	48.15
HORM4v2_660102	système de sécrétion de type III	type III secretion chaperone, CesT family	Vibrio harveyi HY01	83.8
HORM4v2_990001	système de sécrétion de type III	Putative YopE chaperone	Vibrio tubiashii ATCC 19109	95.8
HORM4v2_240081	protéine de virulence	Hydrophilic protein virA protein	Photobacterium damsela subsp. damsela CIP 102761	95.28
HORM4v2_130023	protéine de virulence	Putative virulence-associated protein E; P-loop ATPase	Vibrio tapetis	51.6
		Virulence-associated protein E	Vibrio parahaemolyticus 16	49.13

C- Discussion générale

Les mécanismes de virulence et les modalités de l'infection de *V. harveyi* restent, à ce jour, peu connus, malgré l'importance de cette espèce en tant qu'agent pathogène chez les organismes marins (Austin et Zhang, 2006). Les résultats présentés dans ce chapitre tendent à apporter des informations sur le développement de la vibriose de l'ormeau européen, par l'étude du cycle infectieux du vibron pathogène, du rôle de la température dans l'accomplissement des étapes de ce cycle et des facteurs de virulence potentiels de la souche ORM4.

1. Dynamique d'infection et voie d'entrée de *V. harveyi*

L'article 3 de ce manuscrit expose les résultats concernant l'étude de la voie d'entrée de *V. harveyi* chez l'ormeau européen et de sa dynamique d'infection au sein de l'organisme-hôte.

Des infections expérimentales, d'ormeaux soumis à la présence de la souche ORM4 pendant des temps croissants de 1 à 24h, ont permis de mettre en évidence 1/ que les mortalités engendrées par la vibriose sont d'autant plus précoces et importantes que le temps de contact est élevé, et 2/ qu'une heure de contact suffit à engendrer des mortalités. Ces observations suggèrent donc que la phase d'initiation du cycle infectieux de *V. harveyi* chez l'ormeau européen s'établit dès la première heure de contact, ce qui atteste de sa forte virulence.

L'observation à la loupe binoculaire sous filtre UV, d'ormeaux mis en présence de la souche ORM4-GFP, tend à démontrer que *V. harveyi* possède un tropisme particulier envers les tissus branchiaux. Cette observation corrobore l'hypothèse proposée par Travers et collaborateurs après observation de tissus d'ormeaux moribonds, et a également été établie après observation d'ormeaux japonais *H. discus hannai*, infectés par *V. harveyi* (Sawabe *et al.*, 2007a; Travers *et al.*, 2008a).

Cette constatation est complétée des analyses de quantification par méthode de culture et par PCR quantitative de *V. harveyi* dans les différents tissus de l'ormeau. Ces analyses

montrent : 1/ que la densité de vibrions ayant adhéré ou ayant pénétré les tissus branchiaux des ormeaux est majoritaire, dès 6h après contact, par rapport aux autres organes. Ce résultat semble donc attester que la voie d'entrée de *V. harveyi* chez l'ormeau européen se situerait au niveau des tissus branchiaux.

2/ que *V. harveyi* semble adhérer et envahir le tissu musculaire, le tissu gonadique et digestif, et le système circulatoire des ormeaux.

3/ que la concentration en vibrions dans l'hémolymphe croît avec le temps de contact et est significative dès les premières heures de contact, ce qui suggère son utilité en tant qu'indicateur de l'évolution du cycle infectieux chez l'ormeau.

La rapidité avec laquelle les vibrions pathogènes peuvent être détectés dans l'hémolymphe et leur tropisme pour le tissu branchial nous permet d'imaginer un scénario de cycle infectieux chez les ormeaux (Fig. 40). Ainsi, ils cibleraient, dans un premier temps, le tissu branchial, y pénétreraient jusqu'à atteindre l'artère branchiale qui est directement reliée au cœur (Crofts, 1929; Manganaro *et al.*, 2012). Du cœur, les vibrions pourraient alors atteindre, par le biais du système circulatoire dans lequel ils se multiplieraient, l'ensemble des autres tissus et s'y accumuler jusqu'à induire une septicémie massive.

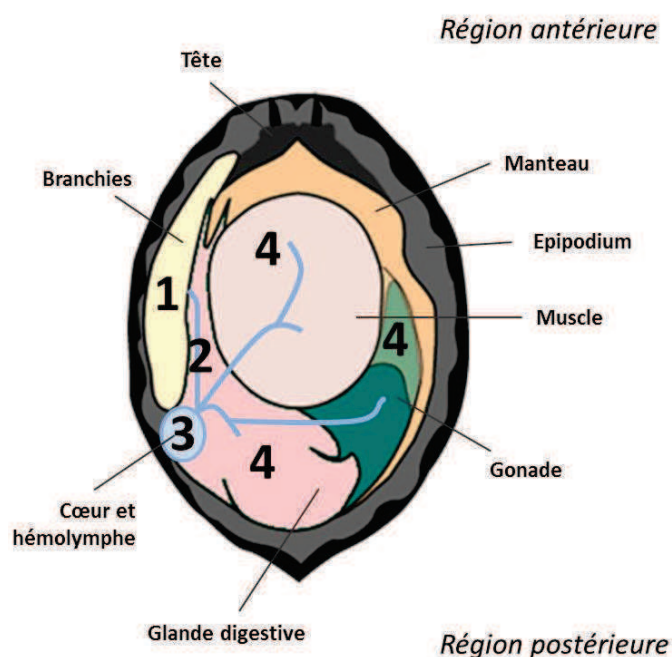


Figure 40 : Cycle infectieux de *V. harveyi* chez l'ormeau européen (en vue ventrale).

1 : adhésion et pénétration au niveau des branchies ; 2 : progression vers l'artère branchiale ; 3 : progression vers le cœur ; 4 : invasion dans les tissus *via* le système circulatoire.

Cette étude a donc permis de révéler que la phase d'initiation de l'infection par *V. harveyi* chez l'ormeau européen intervient rapidement, dès les premières heures de contact ; que sa voie d'entrée semble être située au niveau des tissus branchiaux ; et que des vibrions peuvent être détectés dans le système circulatoire des ormeaux dès les premières heures d'infection, témoignant du début de la phase d'invasion et de multiplication.

2. Température et virulence de *V. harveyi*

La deuxième partie de ce chapitre visait à comprendre l'effet de la température sur la virulence et l'accomplissement du cycle infectieux de *V. harveyi* chez l'ormeau.

L'influence de la température sur le développement d'une vibriose peut s'expliquer par son importance dans la croissance des espèces *Vibrio*, leur mobilité et la synthèse ou l'activité des facteurs de virulence (Bryan *et al.*, 1999; Karlsen *et al.*, 2008; Mahoney *et al.*, 2010; Oberbeckmann *et al.*, 2011; Kimes *et al.*, 2012). La corrélation entre température et initiation de l'infection par *V. harveyi* a également été mise en évidence chez les crevettes *Penaeus monodon* (Alavandi *et al.*, 2006).

Dans le cas de l'ormeau européen, des injections de la souche pathogène ORM4 induisent des mortalités même si elles sont pratiquées à 16°C, i.e. en dessous de la température seuil de déclenchement de la vibriose, en balnéation établie entre 17 et 18°C (Nicolas *et al.*, 2002; Travers *et al.*, 2009a). **Cette observation suggère que la température influence la première phase du cycle infectieux, i.e. la phase d'adhésion et de pénétration du vibron dans l'ormeau.** Cependant des températures inférieures au seuil de déclenchement ne semblent pas induire une inhibition de la virulence de *V. harveyi* lorsque celui a pénétré dans l'organisme-ormeau. Cette hypothèse est corroborée par l'absence de vibrions pathogènes en masse au niveau des tissus branchiaux de l'ormeau lorsqu'ils sont placés à 16°C.

Par ailleurs, à 16°C, le taux de mortalités engendrées par la souche ORM4 est inférieur à celui observé à 19°C, et le début des mortalités apparaît plus tardivement à 16°C (3j vs 36h à 19°C). Or le taux de croissance de la souche ORM4 est deux fois moins important à 16°C qu'à 19°C (Travers, 2008). Ainsi, le retard d'apparition des mortalités à 16°C pourrait être dû à un état de latence des vibrions, pendant lequel la croissance faible ne peut pas permettre

l'induction de la virulence. La régulation de la production de facteurs de virulence étant également dépendante de la densité bactérienne par le biais du mécanisme de « *Quorum sensing* », **une faible croissance de la souche ORM4 à 16°C pourrait expliquer des mortalités moins importantes à cette température du fait d'une réduction de la virulence.**

L'injection de la souche LMG 7890 entraîne des mortalités à 19°C, jusqu'à 75% du stock pour une dose de 10^5 vibrions injectés. Or cette souche n'est pas pathogène pour l'ormeau européen en cas d'inoculation par baignade. **De l'accomplissement de la phase d'initiation de l'infection, i.e. la phase préliminaire à la pénétration des vibrions, dépend donc le déclenchement des mortalités et la réussite de l'infection. Il peut donc être supposé que la souche LMG 7890 ne possède pas les effecteurs nécessaires à l'adhésion et la pénétration des bactéries dans l'ormeau.**

Par ailleurs, le taux de mortalité engendré suite à l'injection de la souche LMG 7890 est nettement inférieur, pour une dose donnée, à celui observé suite à l'injection de la souche ORM4, à 19°C. Il est donc également probable que la souche LMG 7890 soit déficiente en certains facteurs de virulence, présents chez la souche ORM4. L'étude préliminaire des facteurs de virulence potentiels de la souche ORM4 fait donc l'objet de la suite de ce chapitre.

3. Facteurs de virulence potentiels de la souche ORM4

Dans la littérature, la pathogénicité de l'espèce *V. harveyi* est reliée à de nombreux effecteurs, tels que des protéines extracellulaires de type protéase, hémolysine, lipase, ou à la production de polysaccharides bactériens (pour revue Ruwandeepika *et al.*, 2012). Le mécanisme de virulence chez ce vibron apparaît très variable selon l'espèce-hôte ciblée et les souches bactériennes considérées (Zhang et Austin, 2000; Conejero et Hedreyda, 2004; Bai *et al.*, 2010). La souche ORM4 possède, au sein de son génome, des séquences codantes pour de facteurs de virulence impliqués dans l'orientation et l'adhésion aux cellules, dans la cytotoxicité - toxines et hémolysines -, l'hydrolyse moléculaire - protéases, lipases, collagénases - et dans la récupération de nutriments essentiels à son développement - chitinases, sidérophores.

Parmi ces séquences identifiées et homologuées avec des gènes d'autres espèces, une vingtaine d'entre elles n'est pas présente chez la souche non pathogène de référence LMG 7890 (Tableau 11). Certains de ces gènes, propres à la souche ORM4, seraient impliqués dans la mobilité et d'adhésion des vibrions et codent pour une chitinase potentielle, une flagelline potentielle et une protéine du chimiotactisme présentant également une activité hémolysine, *HyIB*. Ces protéines pourraient jouer un rôle non négligeable dans l'adhésion aux cellules de la voie d'entrée. Six gènes codant pour des chitinases ont été détectés chez *V. harveyi*, mais sans établir un lien direct avec la pathogénicité de l'espèce (Svitil *et al.*, 1997). Le gène *HyIB* a été mis en évidence chez plusieurs espèces *Vibrio*, dont *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. caribbeanicus* et *V. cholerae* (Alm et Manning, 1990; Chen *et al.*, 2003; Lux *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2012).

Deux systèmes de gènes toxine/antitoxines (TA) ont également été identifiés chez la souche ORM4. Ces opérons génomiques, RelE et Doc, qui servent à la production d'une molécule toxique pour les cellules et de son antidote afin de s'en prémunir (Fig. 41), ont été identifiés pour la première fois chez *V. harveyi*. Chez les bactéries, la régulation de la croissance et de la mort cellulaires est un atout majeur en conditions stressantes. La synthèse de toxine inhibitrice de la croissance cellulaire est largement connue dans le monde bactérien. Ces toxines peuvent agir au niveau de processus variés tels que la réplication de l'ADN, la stabilité des ARNm, la synthèse protéique (transduction), la biosynthèse de la paroi cellulaire et la production d'ATP (pour revue Diaz-Orejas *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2011). En conditions normales, la toxine et son antitoxine forme un complexe stable qui prévient l'action de la toxine. En conditions stressantes, l'antitoxine moins stable ne peut agir, ce qui induit l'inhibition de la croissance cellulaire voire la mort de la bactérie (pour revue Hayes, 2003). Il a également été démontré que ce processus joue un rôle clé dans la persistance des plasmides au sein de la population bactérienne (pour revue Van Melderen, 2010). En effet, lorsqu'un plasmide porteur de gènes codant pour un système TA est perdu dans une cellule, la toxine stable est libérée de son complexe au fur et à mesure de la dégradation de l'antitoxine moins stable, ce qui entraîne la mort de la cellule. Depuis cette découverte, de nombreux systèmes TA ont été mis en évidence chez les bactéries et les archées (pour revue Yamaguchi *et al.*, 2011). Leurs rôles dans la régulation de l'expression des gènes, le contrôle

des populations bactériennes et la lyse cellulaire sont actuellement reconnus. Par ailleurs, de nombreuses espèces de bactéries pathogènes possèdent ce type de système, ce qui suggère également leur implication dans la virulence ou la résistance aux antibiotiques (pour revue Hayes, 2003). De tels systèmes ont été récemment mis en évidence chez *V. cholerae* et *V. fischeri* (Budde *et al.*, 2007; Respondek *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2011). Chez la souche ORM4 de *V. harveyi*, la virulence semble être permise par l'existence d'un plasmide, absent chez la souche LMG 7890 (Travers, 2008). Les systèmes TA de la souche ORM4 pourraient donc leur servir à conserver ce plasmide relié à la virulence au sein de la population bactérienne. Les deux systèmes TA mis en évidence chez cette souche, les systèmes *Doc* et *RelE*, perturbent le mécanisme de la transduction des ARNm en protéines. La toxine *Doc* se fixe sur la sous-unité 30s du ribosome, organe essentiel à la synthèse protéique, ce qui inhibe donc la transduction sans cliver l'ARNm (Liu *et al.*, 2008). Son antitoxine *HygB* ou *Phd* empêcherait cette fixation en s'associant à la même région sur le ribosome mais sans empêcher la synthèse protéique. L'étude de la structure de la toxine RelE produite par *E. coli*, a révélé son association avec le site A du ribosome et sa capacité à cliver les ARNm après les avoir orientés vers ce site ribosomique (Pedersen *et al.*, 2003). Cette stratégie inhibe donc complètement le processus de transduction.

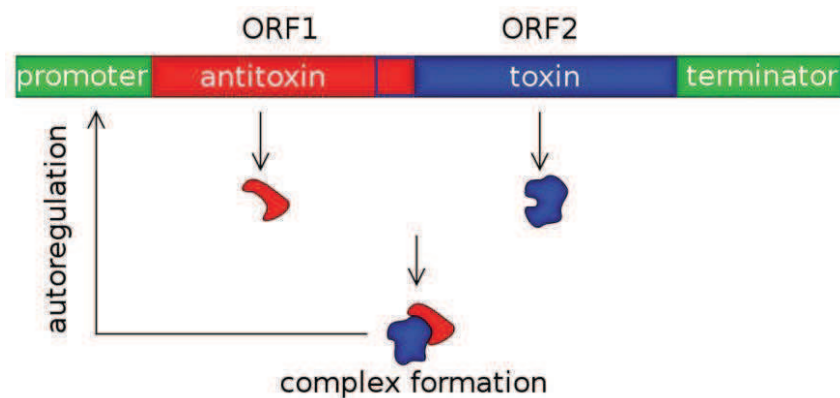


Figure 41 : Opéron Toxine/Antitoxine (Bukowski *et al.*, 2011).

La formation du complexe Toxine/Antitoxine entraîne l'autorépression de l'expression de cet opéron.

Deux gènes codant pour des toxines potentielles de type rTX sont présents également au sein du génome de la souche ORM4 et absents chez la souche LMG 7890. Les protéines rTX sont produites par de nombreuses espèces de bactéries Gram-négatif et peuvent être excrétées de la cellule productrice par un système de sécrétion de type I. Ces protéines sont des toxines cytotoxiques qui possèdent généralement une activité porine, i.e. qui forme un pore au niveau de la membrane de la cellule cible et entraîne donc la lyse cellulaire (Linhartova *et al.*, 2010). Des rTX à multiples activités ont également été découvertes et dénommées MArTX. Chez *V. cholerae*, ces MArTX peuvent provoquer la lyse cellulaire et l'arrondissement des cellules épithéliales en induisant la dépolymérisation des fibres d'actine (Fullner et Mekalanos, 2000). Une étude récente menée par Lo et collaborateurs sur la caractérisation de l'activité de la rTX de *V. vulnificus* a démontré son implication dans la survie bactérienne durant le cycle infectieux notamment par l'inhibition de la capacité de phagocytose des macrophages³⁰ de souris infectées (Lo *et al.*, 2011).

Deux gènes codant pour des pyocines de type S potentielles constituent également le génome de la souche ORM4. Ces toxines ont été, dans un premier temps, décrites chez l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* et peu de données sont disponibles sur l'existence, la caractérisation ou l'action de ces complexes protéiques chez d'autres espèces (pour revue Michel-Briand et Baysse, 2002). Les pyocines de type S sont composées de deux polypeptides dont seul le plus large possède une activité endonucléase (Sano et Kageyama, 1981; Seo et Galloway, 1990). Une fois excrétée hors de la cellule productrice, elles induisent des cassures dans leur génome des cellules ciblées et provoquent ainsi leur lyse. Une étude récente démontre également leur implication dans l'altération structurelle des membranes cellulaires (Ling *et al.*, 2010). La synthèse des pyocines est également induite lors de stress oxydatif, ce qui suggère leur rôle dans les mécanismes défensifs contre l'attaque oxydative des cellules-hôtes (Chang *et al.*, 2005b).

³⁰ Cellules phagocytaires de la réponse immunitaire innée des vertébrés.

Une cyto-toxine « ADP-ribosylating exoenzyme T » (AexT) pourrait également être produite chez la souche ORM4. Initialement décrite chez la bactérie *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida*, pathogène de poissons, chez lesquels elle induirait un arrondissement des cellules (Braun *et al.*, 2002), cette toxine serait directement injectée dans le cytoplasme des cellules cibles *via* des systèmes de sécrétion de type III (Burr *et al.*, 2003; Vilches *et al.*, 2008). La similarité constitutionnelle entre AexT et la toxine YopE leur permettent d'emprunter les mêmes systèmes de sécrétion (Braun *et al.*, 2002).

Les espèces pathogènes du genre *Yersinia* sont capables d'éviter la réponse immunitaire innée de leur hôtes par l'injection, *via* des systèmes de sécrétion de type III, d'effecteurs protéiques dans les cellules-hôtes, les « Yersinia outer proteins » (Yops). En interagissant avec les macrophages, les espèces *Yersinia* provoquent, par le biais de la production de ces Yop, l'altération de la capacité de phagocytose, l'inhibition de la production de ROS, l'induction de l'apoptose et la perturbation des voies de reconnaissance du non-soi (pour revue Cornelis *et al.*, 1998) (Fig. 42). La présence d'un gène codant pour une protéine homologue potentielle à la protéase de type cystéine YopT est révélé au sein du génome de la souche ORM,4 et au sein de la souche HY01 de *V. campbellii*, pathogène de crevettes (Heidelberg et Sebastian, non publié). La protéine YopT clive le site isoprène des Rho-GTPases impliquées dans la constitution du cytosquelette (pour revue Schmidt, 2011). S'en suit alors un arrondissement des cellules observé en quelques minutes chez les macrophages de mammifères (Iriarte et Cornelis, 1998).

La constitution du système de sécrétion de type III, qui permet la translocation des effecteurs Yop, est permise par l'expression de gènes contenus sur 4 loci contigus chez *Y. enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1986). Il serait intéressant de caractériser l'existence de ces loci ou d'homologues de ces protéines chez la souche ORM4 de *V. harveyi*, afin de vérifier si les protéines de type Yop peuvent constituer une stratégie de virulence de cette souche.

Au sein du cytoplasme bactérien, les effecteurs Yop sont portés par des protéines chaperonnes de type SycT ou SycH qui aident à leur orientation au niveau de systèmes de sécrétion et aident à éviter leur interaction avec d'autres protéines bactériennes (pour revue Schmidt, 2011). Deux gènes codant pour des homologues potentiels de ces chaperonnes sont présents au sein du génome de la souche ORM4 et absents chez LMG 7890, ce qui suggère également l'implication d'un tel système de virulence chez la souche ORM4.

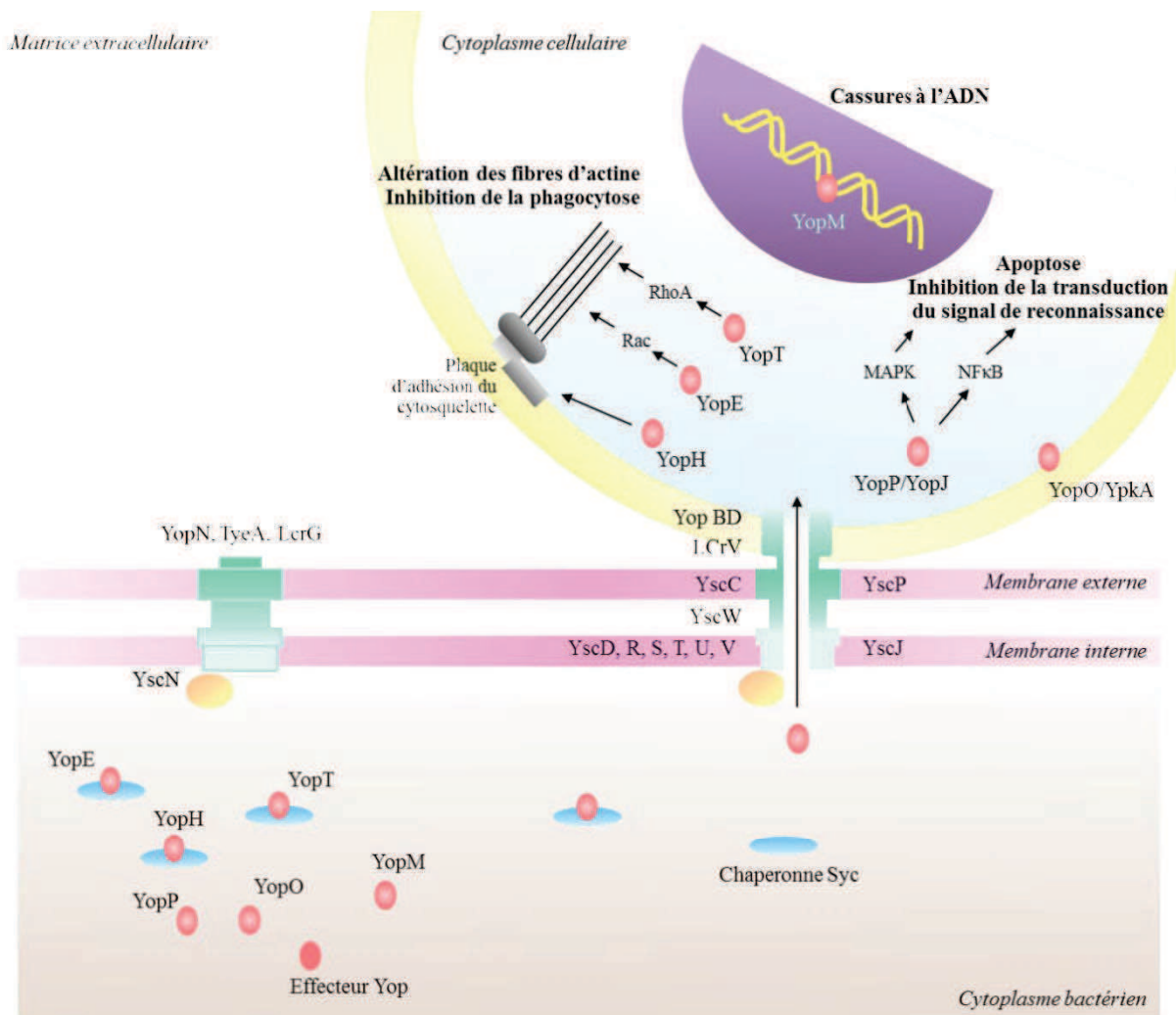


Figure 42 : Schéma du mécanisme de virulence des espèces *Yersinia* basé sur la synthèse de la sécrétion des effecteurs Yop (adapté de Bleves et Cornelis, 2000).

Au sein du cytoplasme bactérien, ces protéines sont captées par des chaperonnes Syc. Tant que le contact entre la bactérie et la cellule-hôte ne s'effectue pas, les protéines YopN, TyeA et LcrG bloquent l'ouverture du système de sécrétion. Une fois le contact établi, le système s'ouvre et peut injecter dans la cellule-hôte les effecteurs Yop qui accompliront dans le cytoplasme cellulaire leur action respective.

D'après les premières analyses du génome de la souche ORM4, nous pourrions décrire un scénario possible des stratégies de virulence orchestrées par ces vibrions (Fig. 43). Il semble exister une certaine spécificité dans l'adhésion de cette souche au niveau des tissus et cellules de l'ormeau. La pénétration dans l'organisme-ormeau pourrait être aidée par la synthèse d'une protéine liée au chimiotactisme qui possède également une activité cytolytique. L'étude des facteurs virulence potentiels de la souche ORM4 montre que sa stratégie majeure pourrait être l'altération de la réponse immunitaire, notamment en provoquant la lyse cellulaire, l'inhibition de la phagocytose ou de la production de ROS. Cette stratégie d'évitement de l'immunité avait déjà été proposée par Travers et collaborateurs après observation de la non-reconnaissance des vibrions de la souche ORM4 par les hémocytes, au contraire des vibrions de la souche LMG 7890 (Travers *et al.*, 2009b).

L'ensemble de ces données relatives à la soustraction *in silico* du génome de la souche ORM4 par rapport à la souche LMG 7890, est en cours d'analyse et fera l'objet d'une publication future.

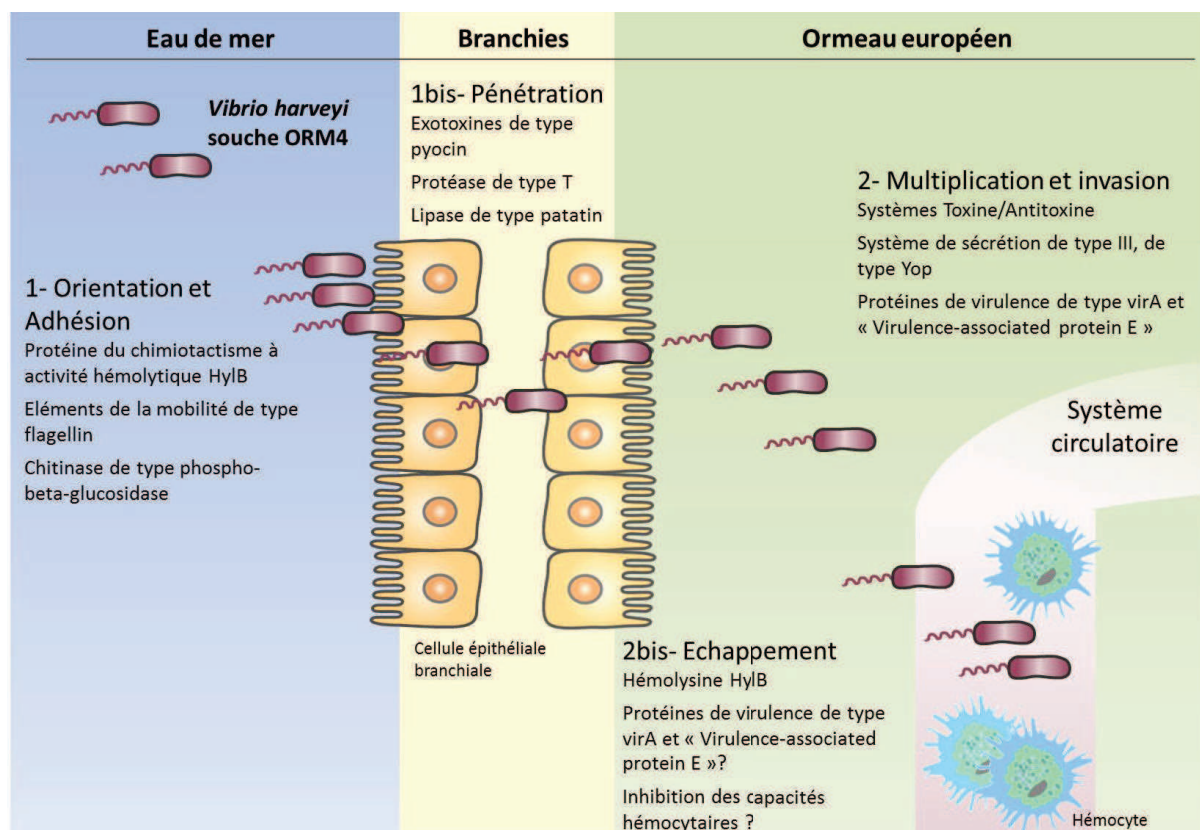


Figure 43 : Schéma hypothétique des premières étapes de l'infection induites par *V. harveyi* chez l'ormeau européen et facteurs de virulence potentiels associés.

Troisième chapitre :

Interaction *V. harveyi* – Ormeau européen : Réponse immunitaire, découplage des facteurs de déclenchement, et stades précoces de l'infection

A-Introduction

Le cycle infectieux de *V. harveyi* chez l'ormeau européen s'accomplit dès les premières heures après leur contact. En effet, l'étape d'adhésion puis de pénétration dans les tissu-hôtes semble se réaliser dès les premières heures voire dès les premières minutes après exposition au niveau du tissu branchial (Cardinaud *et al.*, submitted). De cette étape, débute alors la mise en place de l'interaction entre cette bactérie pathogène et son hôte. A ce jour, seule l'étude de Travers et collaborateurs témoigne de l'impact de *V. harveyi* chez les cellules immunitaires de l'ormeau (Travers *et al.*, 2009b). Ainsi, au bout de 3h de contact *in vitro*, *V. harveyi* semble inhiber la voie de transduction du signal liée à la MAPK p38, et s'en suivrait une inhibition de la reconnaissance de la bactérie et de la phagocytose. Si cette étude a permis d'appréhender la stratégie de virulence de *V. harveyi* chez l'ormeau, il semble nécessaire d'approfondir les connaissances sur la réponse immunitaire de l'ormeau lors de la mise en place de l'interaction, i.e. lors des premières étapes de l'infection.

A ces fins, une étude sur la réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes lors des premières étapes de déclenchement de la vibriose a été menée et est exposée dans l'**article 4** de ce manuscrit.

Par ailleurs, il a été entrepris de spécifier l'impact propre d'une exposition à *V. harveyi* sur le métabolisme branchial, à l'échelle moléculaire, et sur la réponse immunitaire, par le découplage des paramètres température, stade de maturité sexuelle et présence du vibrion pathogène.

A ces fins, des ormeaux sexuellement matures ou immatures ont été placés dans différentes conditions de température – 16 (température inférieure au seuil de déclenchement de la vibriose) ou 19°C (température supérieure au seuil de déclenchement de la vibriose), et exposés ou non à *V. harveyi*. Des mesures d'expression de gènes, d'activités enzymatiques et de caractéristiques hémostatiques ont ensuite été comparées entre ces groupes d'animaux.

Expérimentation animale :

Les ormeaux ont été transférés au laboratoire, acclimatés et exposés à la souche ORM4 de *V. harveyi* selon les protocoles décrits dans l'article 2 de ce manuscrit. Les ormeaux sexuellement immatures (n= 60, 3 ans) utilisés dans cette étude ont été maintenus à l'obscurité, à une température inférieure à 16°C, pendant 8 semaines avant le transfert au laboratoire, et étaient considérés comme tels si le tissu gonadique était minime. En revanche, d'autres individus (n=90, 3 ans) ont été maturés en écloserie en les exposant à un cycle photopériodique adéquat et à une température de 18°C et considérés comme sexuellement matures lorsque leur gonade s'était développée.

Les résultats préliminaires de cette dernière étude sont exposés dans la partie « **Résultats complémentaires** » de ce chapitre.

B- Résultats

1. Article 4 : Réponses des hémocytes à l'échelle moléculaire et cellulaire lors des stades précoces de l'interaction entre *V. harveyi* et l'ormeau européen.

Cellular and molecular responses of hemocytes in European abalone *Haliotis tuberculata* during the earlier stages of vibriosis

Marion Cardinaud ¹, Sylvain Huchette ², Dario Moraga ¹, Christine Paillard ¹

Abstract

Vibrio harveyi is a marine bacterial pathogen responsible for abalone episodic mortalities observed in France, Japan and Australia. In European abalone, *Haliotis tuberculata*, *V. harveyi* is able to invade circulatory system in few hours after contact and to induce death from 2 days of infection. In this study, we investigate the cellular and molecular responses of hemocytes during the first 24h post-contact via analyses of modulation of immune parameters, expression of genes and enzymatic activities involved in immune function. Our results revealed that hemocyte density, viability, H₂O₂ production and phagocytic index have declined during infection course. Moreover, the expression of majority of immune genes decreased after 24h of contact, except for ferritin gene. The enzymatic activities of Glutamine Synthase and Cytochrome C Oxidase were also reduced at 24h post-contact compared to *t0* samples and non-infected animals. Finally, the alteration of immune function appeared to be positively correlated with abundance of *V. harveyi* in hemolymph. Our results showed that *V. harveyi* disturbs the functionality of hemocytes in European abalone, probably by inhibition of effector synthesis and alteration of signal transduction.

1. Introduction

Over the past fifteen years, European abalone populations from the north French coast and aquaculture farms suffer massive summer mortalities that may lead to the loss of 80% of abalone stock (Nicolas *et al.*, 2002). These mortalities have been attributed to the bacterial pathogen *Vibrio harveyi*, and happen in physiological-depressed animals when the seawater surpasses 17°C (Travers *et al.*, 2008d; Cardinaud *et al.*, in press). The severity of this vibriosis may be illustrated by the rapidity of the infection course. The disease reproduction at laboratory has shown that *V. harveyi* adhesion and penetration in abalone tissues occur during the first hours of contact, that the invasion in circulatory system begins from the first 24h post-contact and that mortalities appear from 2 days post-contact (Travers *et al.*, 2008a; Cardinaud *et al.*, submitted). These observations suggest that the establishment of virulence strategy of *V. harveyi* and the immune response of European abalone take place in the earlier stages of vibriosis development.

The abalone immunity is provided by circulating cells or hemocytes which enable to phagocytize stranger particles, synthesize a panel of soluble effectors and preserve themselves from oxidative damages (Hooper *et al.*, 2007a; Travers *et al.*, 2008c). The phagocytic process starts with protein-mediated particle recognition notably *via* lectin action (Nikapitiya *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008c), which leads to signal transduction via two major pathways, NFκB and MAP kinases, that stimulates the synthesis of proteins involved in immunity (Baud and Karin, 2001; Jiang and Wu, 2007; De Zoysa *et al.*, 2010a; De Zoysa *et al.*, 2010b). Then, the particle is attached or captured by cytoskeleton extensions, and internalized inside the hemocyte (Bayne, 1990; Travers *et al.*, 2008c). The elimination of the invader is realized by enzymatic digestion notably mediated by acid phosphatase activity, and by production of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide -H₂O₂ (Tiscar and Mosca, 2004; Wang *et al.*, 2004b). Finally, particle remains are expelled outside the hemocyte. In the serum, several soluble effectors may act as immune helpers. Some proteins may limit pathogen proliferation by limitation of nutrient bioavailability, such as ion holder, or by pathogen immobilization through phenoloxidase pathway and melanin deposit (Cheng *et al.*, 2004a; Travers *et al.*, 2008d). During invasion process, abalone may also prevent the toxic effect of ROS production by activation of particular enzymes, the “ROS-scavengers”, such as superoxide dismutase –SOD (Ekanayake *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010b).

In the course of a bacterial infection, the challenge for the host is to limit the proliferation and invasion of pathogen while its pathogen has to avoid recognition or/and immune destruction

(Combes, 2005). At this day, just one study reported that a contact, realized *in vitro*, between *V. harveyi* and European abalone hemocytes seems to lead to an inhibition of MAPK p38 pathway and phagocytosis after 3h (Travers *et al.*, 2009b). This observation confirms that the impact of *V. harveyi* on hemocyte functions occurs during the first hours post-contact. However, the global immune response during earlier stages of vibriosis remains to be clarified though *in vivo* experiment. Therefore, our objectives were to analyze more precisely the responses of European abalone hemocytes, at cellular and molecular level, during the earlier stages of *V. harveyi* infection, *via* measurements of cellular immune parameters, expression of genes and activities of enzymes involved in immune functions.

2. Material and methods

2.1. Abalone and bacterial strain

Adult abalone (n= 40, 3 years old) were transported in containers filled with macroalgae *Palmaria palmata* from the France *Haliotis hatchery* -Plouguerneau, France (francehaliotis.com) to our laboratory at the European Institute for Marine Studies –Brest, in April 2012. They were placed in six 5L-tanks in which the seawater was replaced daily with seawater pumped from Brest bay (dissolved oxygen concentration > 7.5 mg/L, salinity: 35‰, average temperature: 14°C) and filtered at 1µm. The temperature of seawater was progressively rose by one Celsius degree per day until reach 19°C and animals were maintained at this temperature during one week before experiments.

The strain ORM4 of *Vibrio harveyi*, which was isolated from diseased abalone *H. tuberculata* in Normandy, France, during an episode of massive mortalities in 1999 (Nicolas *et al.*, 2002), was used in this study. Bacteria were grown in Luria-Bertani Broth (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) supplemented with extra salt (20 g. L⁻¹, f.c) in a temperature controlled shaker, at 28°C for 16 hours before challenge.

2.2. Challenge and animal sampling

Abalone were separated in two sets of 3 tanks: a first set, contained animals challenged by immersion with the strain ORM4 at a final concentration of 10^5 CFU.mL⁻¹, and a second set contained animals just immersed in filtered sea water (control group). Ten animals were removed from the tanks just before the infection and were used as *t0* samples. After 3h, 9h and 24h post-infection, five non-infected individuals and five infected animals were sampling.

2.3. Hemolymph collection and hemocyte analysis

About one milliliter of hemolymph was collected from the pedal sinus of each abalone with a 2.5 mL sterile syringe fitted with a 23-gauge needle, containing one milliliter of ice-cold sterile seawater to avoid hemocyte aggregation. Hemolymph was sampled within 30 seconds after removal of individual abalone from each tank to prevent sampling stress, and was kept on ice. The 2 mL of two fold diluted hemolymph were shared in four tubes : 1/ one in which 500 μ L of hemolymph were diluted with 500 μ L of sterile seawater and preserved for flow cytometry analysis, 2/ one in which 500 μ L of hemolymph were preserved for pathogen quantification and stored at -80°C until use; 3/ one in which 500 μ L of hemolymph were centrifuged at 2,500 g for 15 minutes, the supernatant was discarded and the hemocyte pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until gene expression analysis; and 4/one in which 500 μ L of hemolymph were preserved for enzymatic assays and stored at -80°C until use.

Hemocyte density, viability, phagocytic index and H₂O₂ production were measured using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, SanJose, CA) equipped with a 488 nm laser as described in Travers *et al.* (Travers *et al.*, 2008d).

2.4. Bacterial quantification by quantitative PCR

The quantification procedure was made using a 7500 Fast Real-Time PCR System instrument and TaqMan® Universal Master Mix (Applied biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) as described in Cardinaud *et al.* (submitted).

Briefly, five hundred microliters of pure hemolymph were diluted in 500 µL of salted extract buffer (100 mM TrisHCl, 100 mM NaCl and 50 mM EDTA pH8). Total DNAs were extracted using the traditional phenol/chloroform/isoamyl alcohol method method (Sambrook and Russell, 2001) and resuspended in 50 µL of DNase free water. Concentration and quality of DNAs were determined using a spectrometer Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher scientific, USA). Q-PCR measures were made using *V. harveyi* tox-R gene specific primers: Forward CCA-CTG-CTG-AGA-CAA-AAG-CA, Reverse GTG-ATT-CTG-CAG-GGT-TGG-TT, and a Tox-R probe dually labeled with 5' reporter dye Texas Red and a downstream 3' quencher dye BHQ-2 (Schikorski *et al.*, accepted). Each reaction was run in triplicate in a final volume of 20 µL containing 4 µL of DNA sample, 1X of master mix, 300 nm of each primer and 200 nm of probe. Reactions were initiated with activation of the Thermo-Start DNA polymerase during 10 minutes at 95°C followed by 45 amplification cycles (denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 1 min).

The standard samples were obtained after DNAs extraction from 500 µL of hemolymph issued from non-infected abalone and supplemented with 10-fold serially diluted quantities of *V. harveyi* (10⁸ CFU to 0). Viable bacteria count was checked by plating and microscopic enumeration.

2.5. Gene expression analysis

2.5.1. Selection of candidate genes

Six genes were chosen for gene expression analysis due to their implication in general metabolism – Glutamine Synthase (GLS) – and in immune response – Ferritin, Clathrin, Rel/NFκB, Mpeg, and MNK. The gene encoding Elongation Factor 2 (EF2) was selected as reference gene (Table 1). The primers of these sequences were available in the literature in *Haliotis* species and adapted to *H. tuberculata* gene expression, except for Rel/NFκB (Table 1). For Rel/NFκB, a cDNA consensus sequence was created by the software Bioedit Sequence Alignment Editor 7.1.3.0 (Hall, 1999) from other *Haliotis* species sequences. Oligonucleotide

primer sequences were designed using Primer express 3.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). For all the used primers, PCR efficiency (E) was estimated by serial dilutions (from 1/25 to 1/400) of two reference cDNA samples (one non-infected and one infected abalone), using the method described by Yuan *et al.*: $E = 10^{[-1 / \text{slope}]}$ (Yuan *et al.*, 2006).

2.5.2. RNAs isolation and cDNAs synthesis

Total RNAs were extracted in TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and resuspended in RNase-free water. RNAs were quantified by spectrophotometry with a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher scientific, USA) and RNAs quality was assessed using 1% agarose electrophoresis and analysis on an Agilent Bioanalyzer 2100 with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). DNA contamination was prevented using a RTS-DNase kit (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA) on RNA samples, and checked by amplification of a non-reverse transcribed fraction (minus-RT). Reverse transcription was done with one µg of RNA from each sample using random hexamer primers and a RevertAid™ kit (Fermentas International Inc., Burlington, Canada). A minimal difference between minus-RT and cDNA samples was fixed at ten amplification cycles to accept a sample in gene expression results.

2.5.3. Real time q-PCR measurements

RT-qPCR measurements were done as described in Travers *et al.* (Travers *et al.*, 2010). Each run included a negative control in which sterile water replaced cDNA sample, and a reference sample (control) which was made up of a pool of all the samples. Results are presented as changes in relative expression normalized to the reference gene using the method described by Pfaffl (Pfaffl, 2001) and determined by the equation:

Relative expression = $E_{\text{target}}^{\Delta C_{\text{ttarget}}(\text{control-sample})} / E_{\text{ref}}^{\Delta C_{\text{tref}}(\text{control-sample})}$, where E_{target} is the amplification efficiency of the target or gene of interest, E_{ref} is the amplification efficiency of the reference gene and Ct is the cycle threshold.

2.6. Enzymatic assays

Prior to enzymatic activity assays by spectrophotometric methods, hemolymph samples were centrifuged at 2500 g during 15 minutes and only the cytosolic fractions were conserved and stored on ice until used.

Glutamine synthase activity was measured using the indirect method described by Kingdon *et al.*, in which the consumption of β -NADH was monitored at 340nm during the formation of lactate by the enzymatic complex pyruvate kinase/L-lactic dehydrogenase (Kingdon *et al.*, 1968). The final concentrations of the reagents were as follows: 34.1 mM imidazole, 102 mM sodium glutamate, 8.5 mM adenosine 5'-triphosphate, 1.1 mM phosphoenolpyruvate, 60 mM magnesium chloride, 18.9 mM potassium chloride, 45 mM ammonium chloride, 0.25 mM b-nicotinamide adenine dinucleotide, 28 units of pyruvate kinase and 40 units of L-lactic dehydrogenase. The absorbance at 340 nm was read continuously for 30 minutes. The activity was given in GLS unit which correspond to the conversion of 1.0 μ mole of L-glutamate to L-glutamine.

Cytochrome c oxidase activity (CCO) was measured using the method described by Smith (Smith, 1955) and adapted in marine mollusks by Perhirin (Perhirin, pers. comm.), in which the oxidation of the reduced cytochrome c was monitored at 550 nm, using a 600 μ M reduced cytochrome c substrate in 50mM phosphate buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 50 mM Na_2HPO_4 , pH=7.8). The absorbance was read at 550 nm continuously for 15 minutes. The activity was given in CCO unit which correspond to the oxidation of 1.0 μ mole of reduced cytochrome c.

Phenoloxidase activity (PO) was measured using the direct method described by Ford and Paillard in which the oxidation of phenol components was monitored at 490 nm (Ford and Paillard, 2007). Briefly, 100 μ L of 2 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine in 0.2 M Tris-HCl-1% SDS (v/v), pH 8, was added to 100 μ L of total haemolymph and the absorbance at 490 nm was read continuously for 30 minutes. The activity was given in PO unit which correspond to the oxidation of 1 μ mole of L-DOPA.

Acid phosphatase activity (AP) was measured using the method described by Bergmeyer *et al.* in which the consumption of p-Nitrophenyl Phosphate was monitored at 410nm after 10 minutes, using a 6.9 mM p-nitrophenyl phosphate substrate in 41 mM citric acid buffer (Bergmeyer *et al.*, 1974). The activity was given in AP unit which hydrolyze 1.0 μ mole of p-nitrophenyl phosphate.

Superoxide dismutase activity (SOD) was measured using the method described by McCord and Fridovich in which the inhibition of the rate of cytochrome c reduction by superoxide anion generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine reaction was observed at 550 nm (McCord and Fridovich, 1969). The final concentrations of the reagents were as follows: phosphate buffer (50 mM, pH 7.8), hypoxanthine (0.05 mM), xanthine oxidase (0.008 mU/ml), and cytochrome C (0.01 mM). The absorbance at 490 nm was read continuously for 15 minutes. The activity is given in SOD unit which correspond to 50% inhibition of the xanthine oxidase reaction.

The total protein content of all samples was measured using the method of Lowry using the DCT[™] Protein Assay kit (Life Science, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and serial dilution of bovine serum albumin as standards (Lowry *et al.*, 1951).

2.7. Statistics

Statistics tests were done using JMP 10.0.0 software (SAS Institute Inc.).

A non-parametric Wilcoxon test was used to estimate the effects of *V. harveyi* exposure and time of infection on the cellular, transcriptional and enzymatic responses of hemocytes in European abalone. Then, pairwise comparisons were made using a Wilcoxon signed-rank test (Wilcoxon, 1945).

An estimation of Spearman's rank correlation was done between all the measured parameters to remove variable statistically dependent to other (Spearman, 1904). A Principal Component Analysis (PCA) was made from the dataset of all the individuals, followed by a linear correlation between the first principal component of the PCA and the independent variable of *V. harveyi* concentration.

3. Results

3.1. Quantification of *V. harveyi* in hemolymph

Q-PCR quantification of *V. harveyi* in hemolymph of European abalone in this study revealed a possible detection of the pathogen only after 9h post-contact (data not shown). The concentration of *V. harveyi* varied from 116.77 to 227.42 bacteria/mL at 9h post-contact, and from 142.87 to 3167.19 bacteria/mL at 24h post-contact. No bacterium was detected neither in *t0* samples nor in non-infected ones.

3.2. Changes in immune parameters

Hemocyte density was influenced by pathogen exposure, time of infection and the joint factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 44, Table 12). A significant reduction of hemocyte density was observed at 9h and 24h post-infection compared to *t0* samples and non-infected animals.

Hemocyte viability was influenced by time of infection and the joint factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 44, Table 12). A significant reduction of hemocyte viability was observed at 24h post-infection related to *t0* samples and non-infected animals.

H₂O₂ production was influenced by time of infection and the joint factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 44, Table 12). A significant reduction of hemocyte density was observed at 9h and 24h post-infection compared to *t0* samples and non-infected animals.

Phagocytic index was also influenced by time of infection and the joint factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 44, Table 12). Phagocytic index was significantly reduced at 3h compared to *t0* samples and at 24h post-infection compared to *t0* samples and non-infected animals.

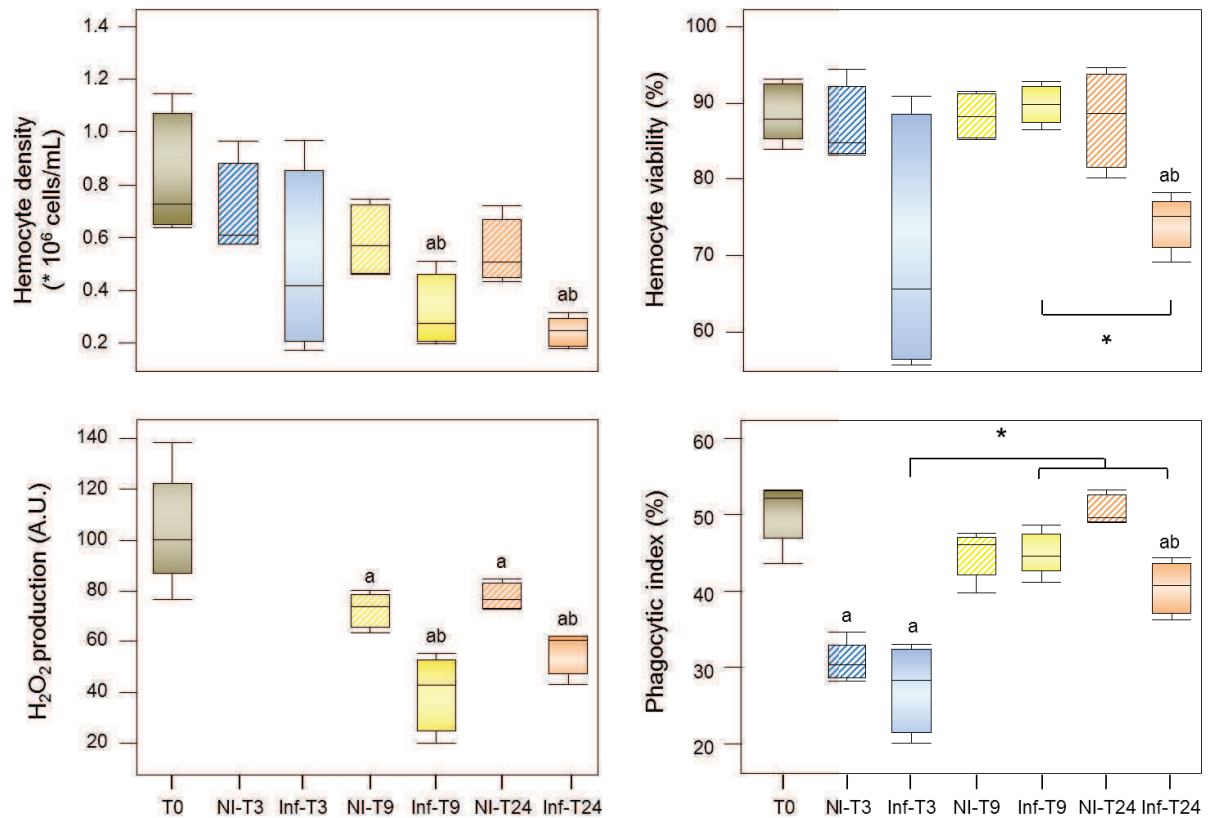


Figure 44: Fluctuations of hemocytes parameters in *H. tuberculata* following *V. harveyi* exposure at 3h, 9h and 24h post-contact –T3, T9, T24.

Hemocyte density, percentage of live hemocytes –hemocyte viability, H₂O₂: hydrogen peroxide production in hemocytes in arbitrary units (A.U.) and phagocytic index: percentage of hemocytes which phagocytized more than 3 beads, were indicated during the earlier stages of vibriosis from 5 individuals per time. *T0* samples correspond to individuals sampled just before the contact between abalone and *V. harveyi*, “NI” to non-infected abalone and “Inf” to infected abalone. Statistical analysis was performed by non-parametric Wilcoxon test. Differences with *t0* samples were highlighted by the letter “a”, differences with non-infected by the letter “b” and differences between two time of contact by asterisks (*), if statistically significant at $p < 0.05$.

3.3. Gene expression analysis

The profile of GLS gene expression depended on pathogen exposure, and the jointed factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 13, Table 45). A significant downregulation of the GLS gene expression was observed at 9h and 24h post-infection compared to *t0* samples. The expression of this gene was also significantly reduced at 24h post-infection related to 3h post-infection samples.

The profile of ferritin gene expression depended on time of infection and the jointed factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 13, Table 45). At 9h post-infection, the expression of ferritin gene was significantly downregulated compared to *t0* samples and non-infected animals sampled at 9h, and compared to 3h post-infection samples. A significant overexpression of this gene was observed at 24h post-infection related to *t0* samples and non-infected animals sampled at 24h, and related to 3h and 9h post-infection samples.

The profile of clathrin gene expression depended on pathogen exposure, and the jointed factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 13, Table 45). A significant downregulation of the clathrin gene expression was observed at 3h and 24h post-infection compared to *t0* samples and the non-infected animals, and at 9h post-infection compared to *t0* samples. The expression of this gene decreased significantly at 24h post-infection than at 3h or 9h post-infection.

The profile of Rel/ NFκB gene expression depended on the jointed effect of pathogen exposure and time of infection (Fig. 13, Table 45). A significant overexpression of Rel/ NFκB gene was observed at 3h post-infection compared to *t0* samples and at 9h post-infection compared to *t0* samples and non-infected animals. At 24h post-infection the expression of Rel/ NFκB gene expression was significantly downregulated related to *t0* samples and to 3h post-infection.

The profile of Mpeg gene expression depended on time of infection and the jointed factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 13, Table 45). At 9h post-infection, a significant upregulation of the Mpeg gene expression was observed related to *t0* samples. The expression of Mpeg gene was significantly down-regulated at 24h post-infection, compared to *t0* samples and non-infected animals, and to 3h or 9h post-infection.

No effect of pathogen exposure or time was revealed on the profile of MNK gene expression (Fig. 13, Table 45). However, this gene was downregulated in four animals sampled at 24h post-infection compared to *t0* samples.

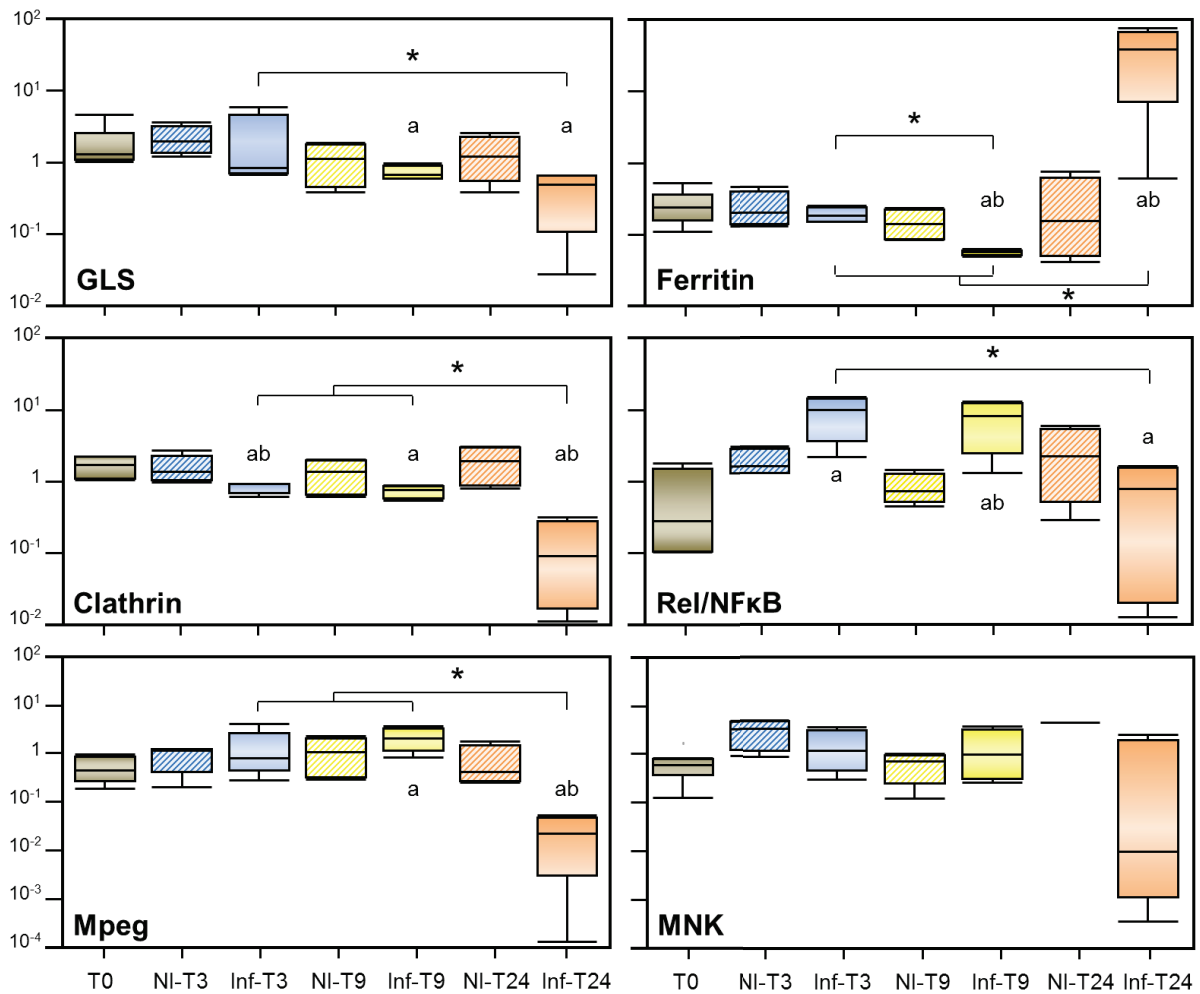


Figure 45: Expression profiles of Glutamine synthase (GLS), Ferritin, Clathrin, Rel/NFκB, Mpeg and MNK genes in *H. tuberculata* hemocytes, following *V. harveyi* exposure at 3h, 9h and 24h post-contact –T3, T9, T24.

The relative gene expression was calculated by the Pfaffl's method (Pfaffl, 2001) using Elongation Factor 2 as reference gene and relative to expression of a pool of all animals considered in this study. T0 samples correspond to individuals sampled just before the contact between abalone and *V. harveyi*, "NI" to non-infected abalone and "Inf" to infected abalone. Statistical analysis was performed by non-parametric Wilcoxon test. Differences with t0 samples were highlighted by the letter "a", differences with non-infected by the letter "b" and differences between two time of contact by asterisks (*), if statistically significant at $p < 0.05$.

3.4. Modulation of enzymatic activities

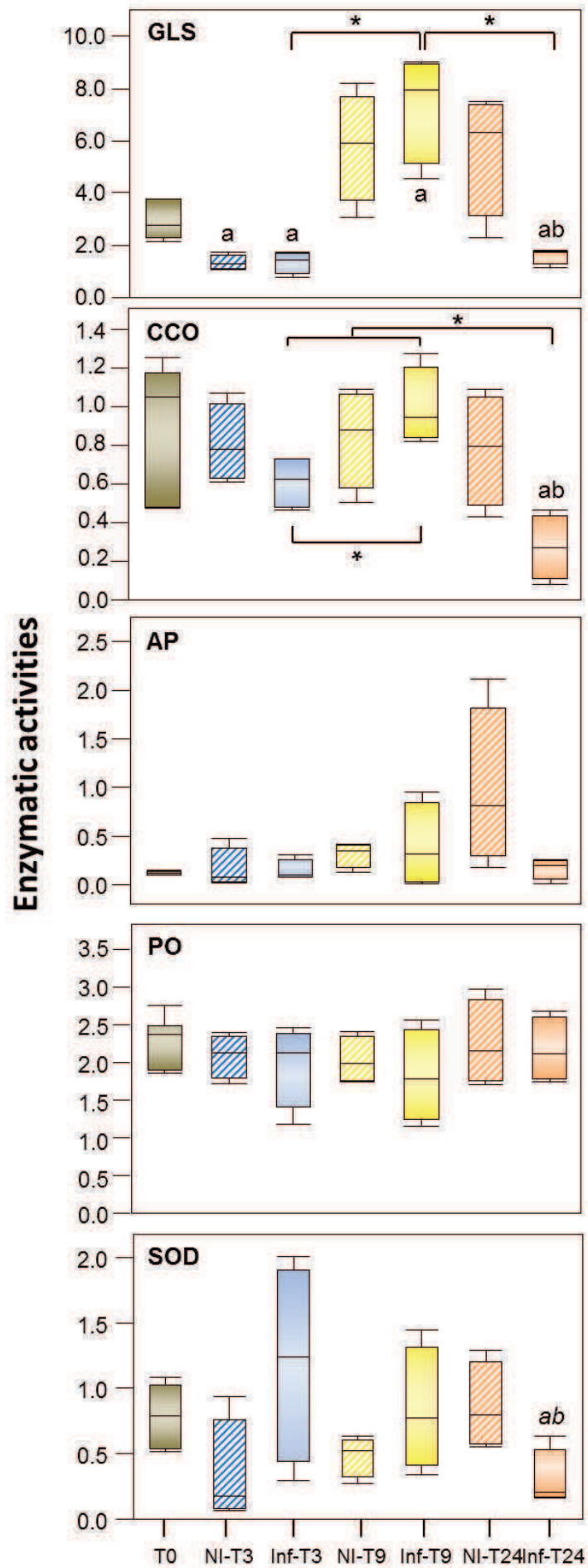
The activity of GLS was determined by time of infection and the jointed factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 46, Table 13). A significant increase of GLS activity was observed at 9h post-infection related to *t0* samples while it was significantly reduced at 24h post-infection compared to *t0* samples and non-infected animals, and to 9h post-infection.

The activity of CCO was determined by the jointed factor of pathogen exposure and time of infection (Fig. 46, Table 13). A significant reduction of CCO activity was identified at 24h post-infection related to *t0* samples and non-infected animals, and to 3h or 9h post-infection.

No effect of pathogen exposure or time of infection was detected for the activities of AP, PO and SOD (Fig. 46, Table 13). However, a significant reduction of SOD activity was perceived at 24h post-infection compared to *t0* samples and non-infected animals at the statistical level of 0.1.

Figure 46: Enzymatic activities of Glutamine synthase (GLS), Cytochrome c oxidase (CCO), Acid phosphatase (AP), Phenoloxidase (PO) and Superoxide dismutase (SOD) in *H. tuberculata* hemocytes, following *V. harveyi* exposure at 3h, 9h and 24h post-contact –T3, T9, T24.

The measures were made by spectrophometrical methods. *T0* samples correspond to individuals sampled just before the contact between abalone and *V. harveyi*, “NI” to non-infected abalone and “Inf” to infected abalone. Statistical analysis was performed by non-parametric Wilcoxon test. Differences with *t0* samples were highlighted by the letter “a”, differences with non-infected by the letter “b” and differences between two time of contact by asterisks (*), if statistically significant at $p < 0.1$.



3.5. Correlation between global response of hemocytes and *V. harveyi* concentration

A PCA was constructed with the dataset of all cellular and molecular measures. The PCA first component explains 38.9% of total variance. Linear regression between first component of this PCA and *V. harveyi* concentration revealed a positive correlation between pathogen concentration and the intensity of global hemocyte response, i.e. decrease of phagocytic index, hemocyte density and viability, of GLS activity and increase of expression of ferritin gene (Fig. 47).

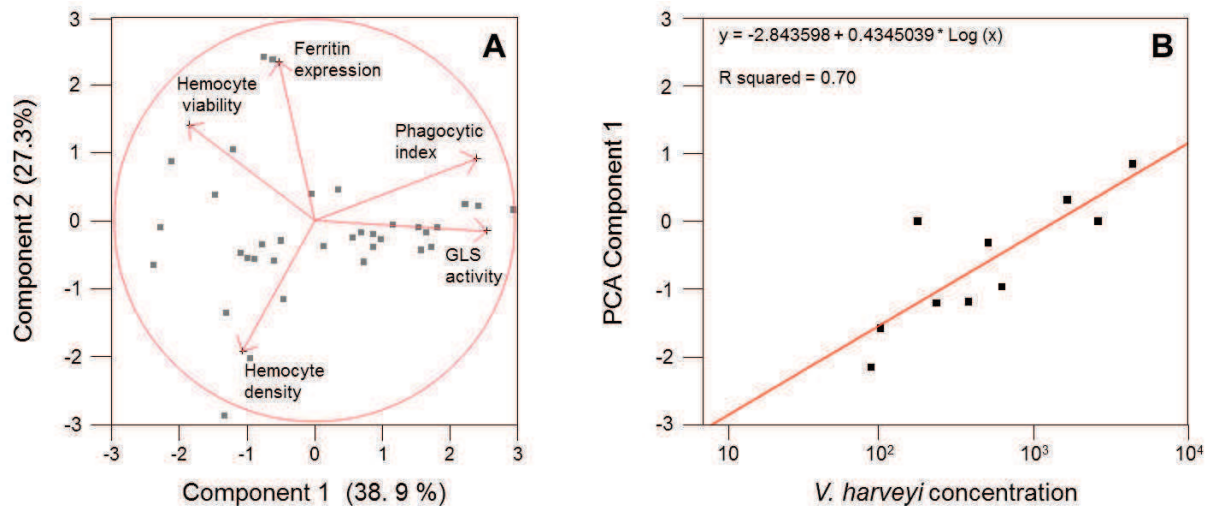


Figure 47: Correlation between global response of *H. tuberculata* hemocytes and *V. harveyi* concentration in hemolymph.

A: Principal component analysis on global hemocyte response dataset from all the individuals, which comprised immune parameter, transcriptional and enzymatic measures. An estimation of Spearman's rank correlation was done between all the measured parameters to remove variable statistically dependent to other.

B: Linear regression between the first principal component of the Principal Component Analysis and the independent variable of *V. harveyi* concentration. *V. harveyi* concentration detection was possible only for ten individuals infected and sampled at 9h and 24h post-contact.

4. Discussion

This study aimed to revealing the responses of hemocytes in European abalone during the earlier stages of *V. harveyi* infection. Our results showed that *V. harveyi* exposure had an impact on immune response both at cellular and molecular level, especially from 9h post-contact. Globally, the immune cellular parameters of hemocyte density, viability, H₂O₂ production and phagocytic index had declined during the infection course. In parallel, a decrease of the expression was observed for the genes encoding GLS, clathrin, Rel/NFκB and Mpeg, while the expression of ferritin gene increase with time during *V. harveyi* exposure. The enzymatic activities of GLS and CCO were also reduced at 24h post-contact compared to *t*₀ samples and non-infected animals. Finally, a positive correlation had been detected between the intensity of global hemocyte response and the concentration of *V. harveyi* in hemolymph.

A previous study noticed that the earlier stages of infection by *V. harveyi*, i.e. adhesion, penetration and invasion of circulatory system took place before 24h post-contact in European abalone (Cardinaud *et al.*, submitted). This observation was confirmed here with the quantification of *V. harveyi* in hemolymph of challenged abalone, that it was effective only from 9h post-contact. This result suggests that the stage of adhesion and penetration in abalone tissues occurred during the first 9h post-contact, and that *V. harveyi* enable to invade the circulatory system of abalone from 9h post-contact. Moreover, in this study, linear regression between global immune response of European abalone and concentration in *V. harveyi* in hemolymph showed a positive correlation between intensity of the response and the concentration of pathogen (Fig. 47).

V. harveyi infection globally induced a decrease of all the measured immune parameters which characterizes an immune-depression status in European abalone (Fig. 44). The first cellular response to *V. harveyi* contact is a tendency to decrease hemocyte density that was observed from the beginning of the infection, and was significant at 9h and 24h post-contact when bacteria were detected in hemolymph. This result may suggest an immune cells infiltration from circulation to organs prone to injury or pathogen penetration, as previously described in several marine mollusks under pollution exposure (Cajaraville *et al.*, 1996). A significant reduction of H₂O₂ production was also detected from 9h post-contact, which had been currently described during *Vibrio* infections in marine mollusks and may correspond to a component of their virulence strategy (Lambert and Nicolas, 1998; Lambert *et al.*, 2003). The *V. harveyi* strategy by avoiding or altering immune functions in European abalone may be

also revealed by the decrease of hemocyte viability and phagocytic index at 24h post-contact (Fig. 44), which may be a consequence of toxin production and inhibition of non-self-recognition by the pathogen. Travers *et al.* had previously revealed an inhibition of the MAPK p38 transduction signal pathways and phagocytosis in European abalone hemocytes exposed *in vitro* to 3h of contact with *V. harveyi* (Travers *et al.*, 2009b).

The development of vibriosis in European abalone may be linked with a modulation of general metabolism. The expression of GLS gene, the activity of GLS and CCO were reduced at 24h post-contact compared to *t0* samples and non-infected animals (Fig. 45 et 46). Glutamine metabolism may be particularly altered in infection process (Wilmore and Shabert, 1998; Karinch *et al.*, 2001). A downregulation of GLS expression had also been observed in the muscle of infected European abalone after 6 days post-contact, which suggest that the reduction of general metabolism in cells is a consequence of vibriosis (Travers *et al.*, 2010).

The expressions of genes implicated in immune function were as well modulated during the earlier stages of infection in European abalone (Fig. 45). An increase of ferritin gene expression was observed from 9h post-contact. The ferritin is a complex protein that enables to sequester ferrous ion to prevent its toxic effect and control ROS production by the Fenton reaction (Fenton and Jackson, 1899). Iron sequestration may constitute a component of the immune response in invertebrate to limit its bioavailability for *Vibrio* proliferation (Wright *et al.*, 1981; Beck *et al.*, 2002; Stork *et al.*, 2002; Doherty, 2007) and may confer a protective action against *V. harveyi* infection (Maiti *et al.*, 2010). In our study, ferritin seems to be implicated in the earlier response of European abalone to *V. harveyi* assault. An increase of the expression of ferritin gene was also noticed after 2 days of challenged in survivor individuals (Travers *et al.*, 2010).

A reduction of clathrin gene expression was observed from 3h post-contact (Fig. 45). This protein is involved in the bacterial internalization by phagocytic cells (Veiga and Cossart, 2006; Pauly and Drubin, 2007). The process of phagocytosis is a central mechanism of immune function in invertebrate, and capacity of phagocytosis is reported to be correlated with disease resistance in abalone (Hooper *et al.*, 2007a). A downregulation of clathrin expression may have a serious impact on immune function during earlier stages of vibriosis in European abalone, and supplements the hypothesis of an alteration of phagocytosis process by *V. harveyi*.

A modulation of the expressions of Rel/NFκB and Mpeg was also observed during the earlier stages of vibriosis in European abalone (Fig. 45). Both genes appeared to be overexpressed before 24-post-contact when *V. harveyi* was not or few detected in hemolymph, and significantly downregulated at 24h post-contact when average concentration of *V. harveyi* in hemolymph surpasses 10² bacteria/mL. The family of Rel/NFκB transcription factors is particularly known for its role in immunity, inflammation and apoptosis process (Hoffmann and Baltimore, 2006). Components of Rel/NFκB signalling pathway has been recently identified in marine mollusks and in abalone species (Montagnani *et al.*, 2004; Jiang and Wu, 2007; De Zoysa *et al.*, 2010b; Huang *et al.*, 2012). Mpeg homologues were characterized in four abalone species and possess structural similarities with a mammalian perforin (Mah *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008a; Kemp and Coyne, 2011). The regulation of Mpeg mRNA expression in marine invertebrates during challenge with bacteria or LPS suggests that this protein constitutes an effector in innate immune response to counteract invading pathogens (Wiens *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008b; He *et al.*, 2011). Our results suggest that the response of hemocytes to *V. harveyi* assault was to upregulate the expression of Rel/NFκB and Mpeg genes. When being in significant number in hemolymph, *V. harveyi* may lead to an inhibition of Rel/NFκB signalling pathway and an inhibition to the immune effector synthesis.

In conclusion, vibriosis infection in European abalone seems to have an impact on hemocyte responses both at cellular and molecular levels from the earlier stages of the infection. *V. harveyi* appears to alter immune functions mediated by hemocytes when bacteria were present in significant number in hemolymph. Moreover, in the light of our results, we can hypothesize that the effectiveness of *V. harveyi* invasion in abalone tissues is due to its capacity to avoid and disturb immune function, notably by reduction of hemocyte functionalities, and inhibition of signalling pathways and immune effector synthesis. It should be interesting to make a link between hemocyte responses and occurrence of virulence factor of *V. harveyi*, for example *via* the measure of virulence gene expression during infection course, in hemolymph and in gills, which is its putative portal of entry in abalone (Cardinaud *et al.*, submitted).

Tables

Table 12: Primer sequences used in real time qPCR analysis.

Gene	Primer sequences	Biological function	Literature source	Efficiency in <i>H. tuberculata</i>
Elongation factor 2	ATGGAGTTTTGTGCGATGAGAA TCGGCGTGGAGAGTCACAT	Transduction – reference gene	Travers <i>et al.</i> ^a	1.07
Glutamine synthase	GCGACACCTGCCGAGAAGT AGTTATTGAAGAAGCCATCGAGAGA	General metabolism	Travers <i>et al.</i> ^a	1.94
Ferritin	CGTGACGACTGGGCATTACTC GGACCACATCACCAACCTGAA	Stress response – ferrous ion holder	Travers <i>et al.</i> ^a	1.96
Clathrin	CACTCGCTCGGTCAACTTCTT CTGGTAGTCCTCCTCCTCAATGA	Cell exchange – Internalization	Travers <i>et al.</i> ^a	0.98
Mpeg	AGGTWGCTTCGCTRTGGT TCAYTCCCTGCTGGYTGTTCT	Immunity – perforin	Cardinaud <i>et al.</i> , ^b	1.01
MNK	AATGGAGGATAACCGCAAAG GAGATTCAGATGTCCGCACC	Signal transduction – MAPK pathway	van der Merwe <i>et al.</i> ^c	1.03
Rel/NFκB	TCGTCCGCAACCCTTCT GGGTGGTTCAGTGAGTGAGAGA	Signal transduction – Transcription factor	this study	0.87

a (Travers *et al.*, 2010)

b (Cardinaud *et al.*, in press)

c (van der Merwe *et al.*, 2011)

Table 13: Effects of pathogen exposure and time on data of gene expression analysis, immune parameters and enzymatic activity measures, estimated by Wilcoxon tests. The values in bold are statistically significant at the level of 0,05.

Gene and variable tested	P value
<i>Immune parameters</i>	
Hemocyte density	
Pathogen exposure	0.0171
Time	0.0073
Pathogen exposure x time	0.0048
Viability	
Pathogen exposure	0.0820
Time	0.0367
Pathogen exposure x time	0.0164
H ₂ O ₂ production	
Pathogen exposure	0.0922
Time	0.0007
Pathogen exposure x time	0.0007
Phagocytic index	
Pathogen exposure	0.2220
Time	<0.001
Pathogen exposure x time	<0.001
<i>Gene expression data</i>	
Glutamine synthase	
Pathogen exposure	0.0031
Time	0.0520
Pathogen exposure x time	0.0240
Ferritin	
Pathogen exposure	0.9706
Time	0.0308
Pathogen exposure x time	0.0035
Clathrin	
Pathogen exposure	0.0005
Time	0.1660
Pathogen exposure x time	0.0058
Rel/NFκB	
Pathogen exposure	0.6425
Time	0.0779
Pathogen exposure x time	0.0164
Mpeg	
Pathogen exposure	0.9859
Time	0.0072
Pathogen exposure x time	0.0110
MNK	
Pathogen exposure	0.1876
Time	0.2153
Pathogen exposure x time	0.1355

<i>Enzymatic activities</i>			
Glutamine synthase			
	Pathogen exposure		0.3461
	Time		0.0002
	Pathogen exposure	x	0.0004
time			
Cytochrome c oxidase			
	Pathogen exposure		0.3428
	Time		0.0506
	Pathogen exposure	x	0.0479
time			
Acid phosphatase			
	Pathogen exposure		0.3356
	Time		0.0762
	Pathogen exposure	x	0.1043
time			
Phenoloxidase			
	Pathogen exposure		0.5016
	Time		0.5598
	Pathogen exposure	x	0.8952
time			
Superoxide dismutase			
	Pathogen exposure		0.5705
	Time		0.9493
	Pathogen exposure	x	0.0653
time			

2. Résultats complémentaires : analyse préliminaire du découplage des facteurs température, maturité sexuelle et l'exposition à *V. harveyi* sur le métabolisme branchial et la réponse immunitaire

La réponse des ormeaux lors d'une exposition à *V. harveyi* a été analysée au niveau du site d'entrée du vibrion pathogène, à savoir le tissu branchial, et au niveau des cellules hémycytaires. A ces fins, des mesures d'expression de gènes, d'activités enzymatiques et de caractéristiques hémycytaires ont été comparées entre des ormeaux sensibles à la vibriose, i.e. sexuellement matures exposés à *V. harveyi* à 19°C (contrôle positif) et quatre autres groupes d'animaux :

- des ormeaux matures acclimatés à 19°C et non exposés au vibrion afin de tester l'effet de la présence de l'agent pathogène ;
- des ormeaux matures acclimatés à 16°C et exposés au vibrion afin de tester l'effet de la température de l'eau ;
- des ormeaux immatures acclimatés à 19°C et exposés au vibrion afin de tester l'effet du stade de maturité sexuelle ;
- et des ormeaux immatures acclimatés à 16°C et non exposés au vibrion afin de tester l'effet groupé des facteurs température, stade de maturité sexuelle et présence de *V. harveyi*.

a. Métabolisme branchial

Expression de gènes

Dans un premier temps, l'influence de la température, de la maturité sexuelle et de l'exposition à *V. harveyi* a été étudiée par l'analyse de l'expression de gènes d'intérêt, lors des premières heures d'exposition, au niveau des branchies d'animaux exposés aux conditions préalablement citées (Fig. 48). Ces gènes ont été sélectionnés pour leur implication dans la respiration cellulaire – sous-unité F0 de l'ATP synthétase (ATPs), sous-unité III de la Cytochrome C Oxydase (CCO), et la sous-unité 5 de la NADH déshydrogénase ;

et dans la réponse au stress – ferritine, « Heat-Shock Protein 71 » (hsp71) et « thioredoxin peroxidase » (TPx). La méthode d'analyse utilisée est décrite dans l'article 4 de ce manuscrit.

Réponse des ormeaux contrôles positifs

Chez les ormeaux sexuellement matures exposés à *V. harveyi* à 19°C, une augmentation significative de l'expression des gènes de la TPx après 3h d'exposition, et de l'ATPs après 6h d'exposition, a été observée, alors que l'expression de ces gènes est inhibée respectivement après 9h d'exposition et après 24h d'exposition, par rapport à T0. Une augmentation de l'expression du gène de la hsp71 est également significative après 6h d'exposition.

Effet de la présence de l'agent pathogène

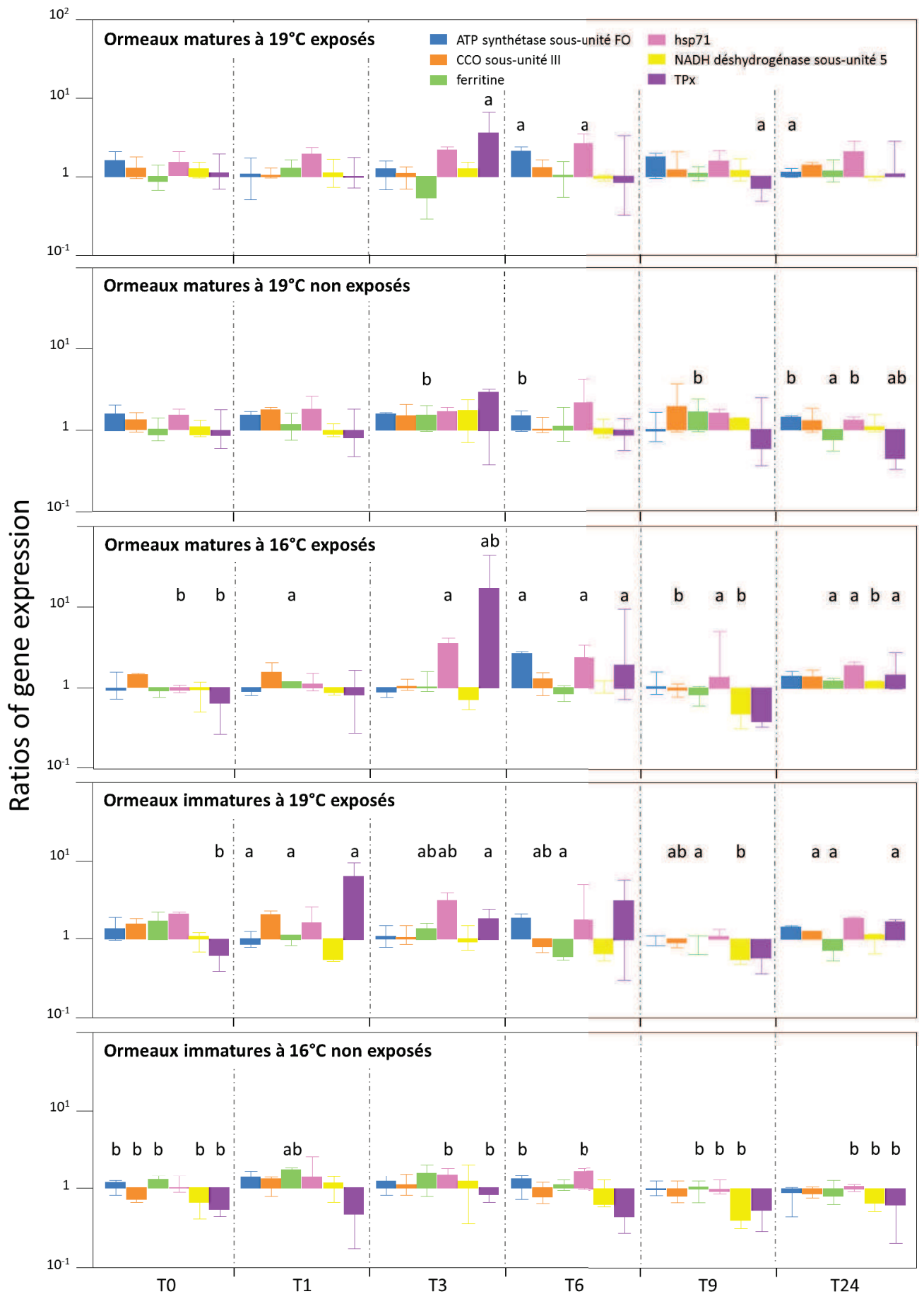
Une différence significative entre l'expression du gène de l'ATPs chez les ormeaux matures acclimatés à 19°C et non exposés à *V. harveyi* est observée après 6h d'exposition, par rapport aux contrôles positifs.

Figure 48 : Expressions de gènes d'intérêt liés au métabolisme branchial, lors des stades précoces de l'interaction entre *V. harveyi* et l'ormeau européen.

Les animaux sexuellement matures ou immatures acclimatés à 16 ou 19°C ont été exposés ou non au vibriion pathogène, et l'expression de gènes clés a été analysée par Real-time PCR sur 24h d'exposition. Les rectangles représentent la médiane de ratios d'expression de gènes calculés par la méthode de Pfaffl, 2001, en considérant le gène « Elongation Factor 2 » comme gène de référence, de 5 réplicats biologiques par condition et par temps. Les barres correspondent à l'étendue des 5 valeurs de ratios d'expression de gènes.

T0 : temps de prélèvement préalable à la mise en contact avec *V. harveyi* ; T1 : 1h post-contact ; T3 : 3h post-contact ; T6 : 6h post-contact ; T9 : 9h post-contact et T24 : 24h post-contact.

L'analyse statistique a été effectuée par l'application de tests de Wilcoxon, la limite de significativité des tests a été fixée à 0,05. Les différences entre une valeur d'expression de gènes en un temps donné et le temps T0 sont indiqués par la lettre « a », et entre une valeur d'expression de gènes en un temps donné et la valeur d'expression de gènes chez les ormeaux matures à 19°C exposés à *V. harveyi* au même temps par la lettre « b ».



Effet de la température

Chez les ormeaux sexuellement matures exposés à *V. harveyi* à 16°C, l'analyse transcriptomique montre une augmentation significative de l'expression du gène de la TPx dès 3h jusqu'à 24h après contact à l'exception de la mesure effectuée après 9h d'exposition, et du gène de la hsp71 dès 3h d'exposition, par rapport à t0. Une augmentation de l'expression de gène codant pour l'ATPs est également significative après 6h d'exposition par rapport à T0. Le gène de la ferritine est surexprimé après 3h et 24h après contact par rapport à T0.

Effet du stade de maturité sexuelle

Chez les ormeaux sexuellement immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, une augmentation de l'expression du gène de la ferritine est significative après 3h, 6h, et 24h d'exposition par rapport à T0. Une surexpression du gène de la hsp71 est également significative après 3h d'exposition par rapport à T0 et à l'expression chez les individus matures exposés à *V. harveyi* à 19°C. A l'inverse, l'expression des gènes codant pour la ferritine et sous-unité III de la CCO est significativement réduite respectivement dès 1h après contact et 6h après contact par rapport à T0.

Effet conjoint des facteurs de déclenchement de la vibriose

Au sein des ormeaux sexuellement immatures non exposés à *V. harveyi* et acclimatés à 16°C, l'expression du gène de la hsp 71 est significativement réduite dès 3h après contact par rapport aux individus matures exposés à *V. harveyi* à 19°C. Les ratios médians d'expression des gènes de la TPx et de l'ATPs sont significativement inférieurs à ceux des individus matures exposés à *V. harveyi* à 19°C.

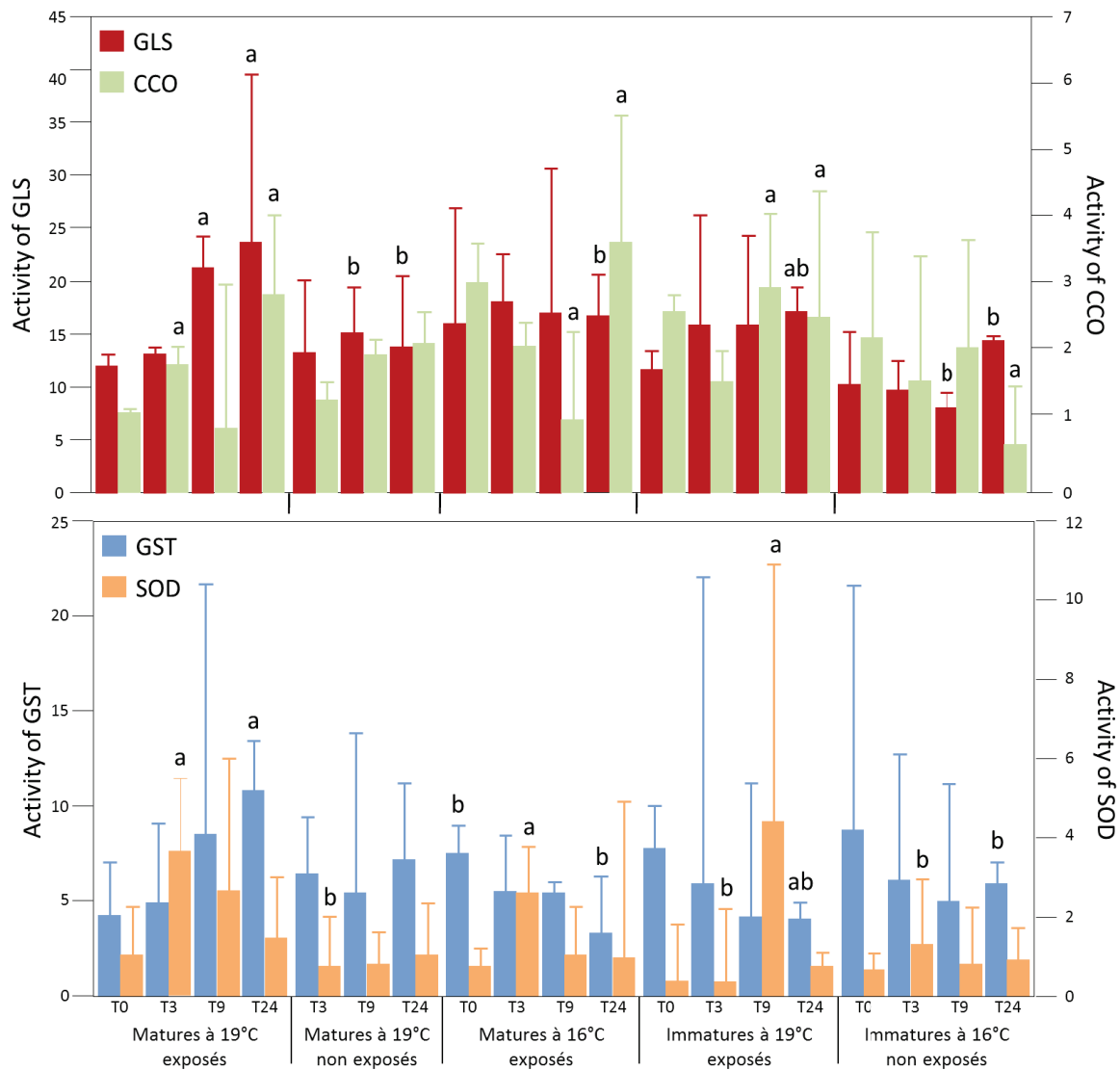


Figure 49 : Activités enzymatiques de la glutamine synthétase (GLS), de la Cytochrome C oxydase (CCO), de la Glutathion-S-transférase (GST) et de Superoxyde dismutase (SOD) au niveau des branchies d'ormeaux, lors des stades précoces de l'interaction avec *V. harveyi*.

Les animaux sexuellement matures ou immatures exposés à 16 ou 19°C ont été mis en contact ou non avec le vibriion pathogène, et les activités enzymatiques ont été mesurées par spectrophotométrie, sur 24h d'exposition. Les rectangles représentent la médiane et les barres correspondent à l'étendue des activités enzymatiques mesurées chez 5 ormeaux par condition et par temps.

T0 : temps de prélèvement préalable à la mise en contact avec *V. harveyi* ; T3 : 3h post-contact ; T9 : 9h post-contact et T24 : 24h post-contact.

L'analyse statistique a été effectuée par l'application de tests de Wilcoxon, la limite de significativité des tests a été fixée à 0,05. Les différences entre une valeur d'activité enzymatique en un temps donné et le temps T0 sont indiqués par la lettre « a », et entre une valeur d'activité enzymatique en un temps donné et la valeur d'activité enzymatique chez les ormeaux matures à 19°C exposés à *V. harveyi* au même temps par la lettre « b ».

Activités enzymatiques

Dans un second temps, les activités d'enzymes liées au métabolisme général – Glutamine Synthétase (GLS) et Cytochrome C oxydase (CCO), et à la réponse au stress oxydatif – Glutathion-S-transférase (GST) et Superoxyde dismutase (SOD), ont été analysées par spectrophotométrie chez les mêmes individus, selon les méthodes décrites dans l'article 4 de ce manuscrit et selon la méthode de Habig et collaborateurs (Habig *et al.*, 1974) (Fig. 49).

L'activité de l'enzyme GLS est influencée par le temps d'exposition, chez les ormeaux exposés à *V. harveyi* à 19°C indépendamment de leur stade de maturité sexuelle. L'activité de la GLS est significativement supérieure après 9h et 24h d'exposition chez les individus contrôles positifs, et après 24h d'exposition chez les individus immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0. Après 24h d'exposition, l'activité de la GLS est significativement plus élevée chez les contrôles positifs que chez tous les autres groupes d'animaux.

L'activité de l'enzyme CCO est influencée par le temps d'exposition, chez les ormeaux exposés à *V. harveyi* à 16 ou 19°C et chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C. L'activité de la CCO augmente significativement après 3h et 24h d'exposition chez les individus contrôles positifs, et après 9h et 24h d'exposition chez les individus matures exposés à *V. harveyi* à 16°C et chez les individus immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0.

L'activité de l'enzyme GST est influencée par le temps d'exposition, chez les ormeaux contrôles positifs. L'activité de la GST est significativement supérieure après 24h d'exposition chez ces animaux par rapport à T0 et, par rapport aux ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 16°C, aux ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C et aux ormeaux immatures à 16°C.

L'activité de l'enzyme SOD est influencée par le temps d'exposition, chez les ormeaux exposés à *V. harveyi* à 16 ou 19°C et chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C. L'activité de la SOD est significativement supérieure après 3h d'exposition chez les individus matures exposés à *V. harveyi* à 16°C et 19°C par rapport à T0 et, par rapport aux autres groupes d'ormeaux. Une augmentation significative de l'activité de la SOD est

également observée chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C après 9h d'exposition.

Mesure de la peroxydation lipidique

Afin de vérifier le niveau de peroxydation lipidique dans les cellules branchiales, un dosage de la concentration en malondialdéhyde (MDA) a été effectué selon le protocole décrit par Vouras et Dailianis (Vouras et Dailianis, 2012) (Fig. 50).

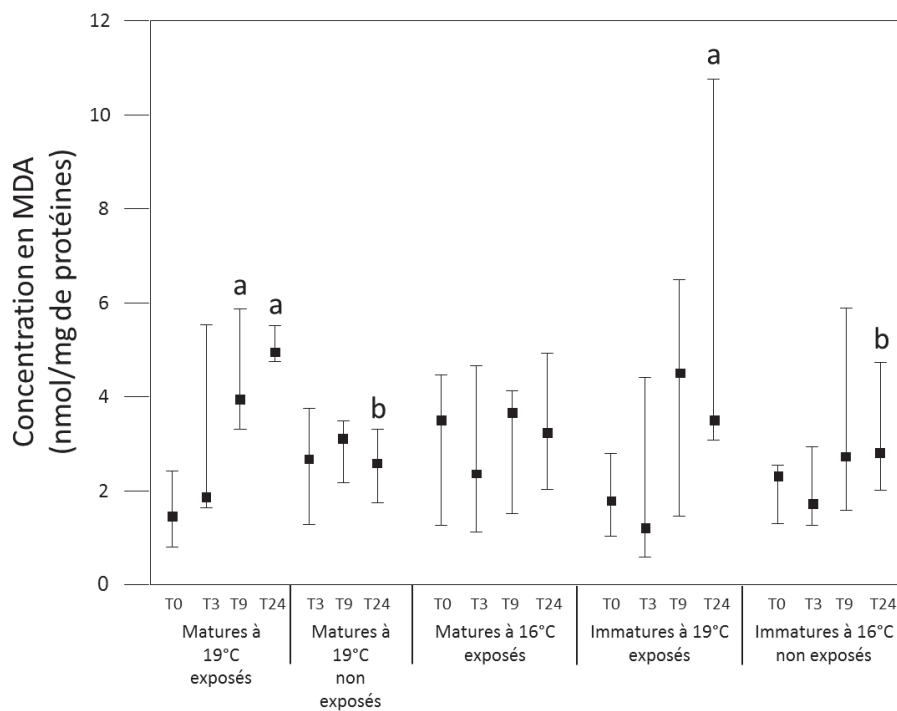


Figure 50 : Concentration en malondialdéhyde (MDA) au niveau des branchies d'ormeaux, lors des stades précoces de l'interaction avec *V. harveyi*.

Les animaux sexuellement matures ou immatures exposés à 16 ou 19°C ont été mis en contact ou non avec le vibrion pathogène, et la concentration en MDA a été mesurée par spectrophotométrie. Les points représentent la médiane et les barres correspondent à l'étendue des mesures de 5 ormeaux par condition et par temps. T0 : temps de prélèvement préalable à la mise en contact avec *V. harveyi* ; T3 : 3h post-contact ; T9 : 9h post-contact et T24 : 24h post-contact.

L'analyse statistique a été effectuée par l'application de tests de Wilcoxon, la limite de significativité des tests a été fixée à 0,05. Les différences entre une valeur d'activité enzymatique en un temps donné et le temps T0 sont indiqués par la lettre « a », et entre une valeur d'activité enzymatique en un temps donné et la valeur d'activité enzymatique chez les ormeaux matures à 19°C exposés à *V. harveyi* au même temps par la lettre « b ».

Les résultats révèlent que la concentration en MDA dépend du temps d'exposition chez les ormeaux exposés à *V. harveyi* à 19°C indépendamment de leur stade de maturité sexuelle.

Une augmentation significative de la concentration en MDA a été observée 9h et 24h après contact chez les individus contrôles positifs, et après 24h d'exposition chez les individus immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0. La concentration en MDA est significativement plus faible après 24h d'exposition chez les individus matures non exposés à *V. harveyi* à 19°C et chez les individus immatures non exposés à *V. harveyi* à 16°C par rapport aux individus matures exposés à *V. harveyi* à 19°C.

b. Réponse immunitaire

Les caractéristiques immunitaires d'ormeaux sexuellement matures ou immatures, acclimatés à 16 ou 19°C et exposés ou non à *V. harveyi* ont été analysées à l'échelle transcriptomique et cellulaire.

Expression des gènes

L'analyse de l'expression de gènes clés dans les hémocytes de ces ormeaux a été effectuée lors des 24 premières heures d'exposition, selon la méthode décrite dans l'article 4 de ce manuscrit et pour les mêmes gènes considérés, à savoir les gènes codant pour la glutamine synthétase (GLS), la ferritine, la clathrine, la « macrophage-expressed protein » (Mpeg), une protéine de type Menkes associée à la voie de transduction du signal des MAPK (MNK) et une protéine de type Rel/NFκB (Fig. 51).

Réponse des ormeaux contrôle-positifs

Chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 19°C, les résultats révèlent une modulation significative de l'expression des gènes de la GLS, de la ferritine, de la clathrine et de la Mpeg au cours du temps d'exposition. L'expression du gène de la GLS diminue significativement

dès 3h après contact, par rapport à T0. L'expression de la ferritine diminue significativement après 9h d'exposition puis augmente de manière significative après 24h d'exposition, par rapport à T0. Une réduction significative de l'expression des gènes de la clathrine et de la Mpeg est observée après 24h par rapport à T0. L'expression des gènes codant pour la MNK et la Rel/NFκB tend également à être réduite par rapport à T0.

Effet de la présence de l'agent pathogène

Des différences d'expression de gènes ont été détectées au sein des ormeaux matures non exposés à *V. harveyi* à 19°C par rapport au groupe précédent. Ainsi l'expression des gènes de la GLS après 3h d'exposition, et de la ferritine après 9h d'exposition est significativement plus élevée chez les individus matures non exposés à *V. harveyi* à 19°C. L'expression du gène de la ferritine est également plus faible, alors que celles de la clathrine et de la Mpeg sont plus élevées après 24h d'exposition que chez les individus contrôles positifs.

Effet de la température

Chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 16°C, une réduction de l'expression du gène de la ferritine est observée après 3h et 9h d'exposition par rapport à T0. Une différence d'expression du gène de la Mpeg est également détectée après 24h d'exposition entre les individus matures exposés à *V. harveyi* à 16°C et les individus contrôles positifs.

Effet du stade de maturité sexuelle

Au sein des ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, les résultats montrent une modulation significative de l'expression de tous les gènes au cours du temps d'exposition. Une augmentation significative de l'expression de la MNK est observée après 3h d'exposition par rapport à T0. Après 3h d'exposition, l'expression des gènes de la GLS, de la ferritine et de la clathrine est significativement plus forte par rapport aux individus contrôles positifs. Après 9h d'exposition, une réduction significative de l'expression des gènes de la GLS et de la ferritine est apparente alors que celle de la Mpeg augmente significativement par rapport à

T0. Après 24h d'exposition, l'expression des gènes de la GLS, de la ferritine et de la clathrine augmente significativement alors que celle des gènes de la MNK et de la Rel/ NFκB diminue significativement, par rapport à T0. L'expression des gènes de la GLS, de la clathrine est alors plus élevée que celle observée chez les contrôles positifs.

Effet conjoint des facteurs de déclenchement de la vibriose

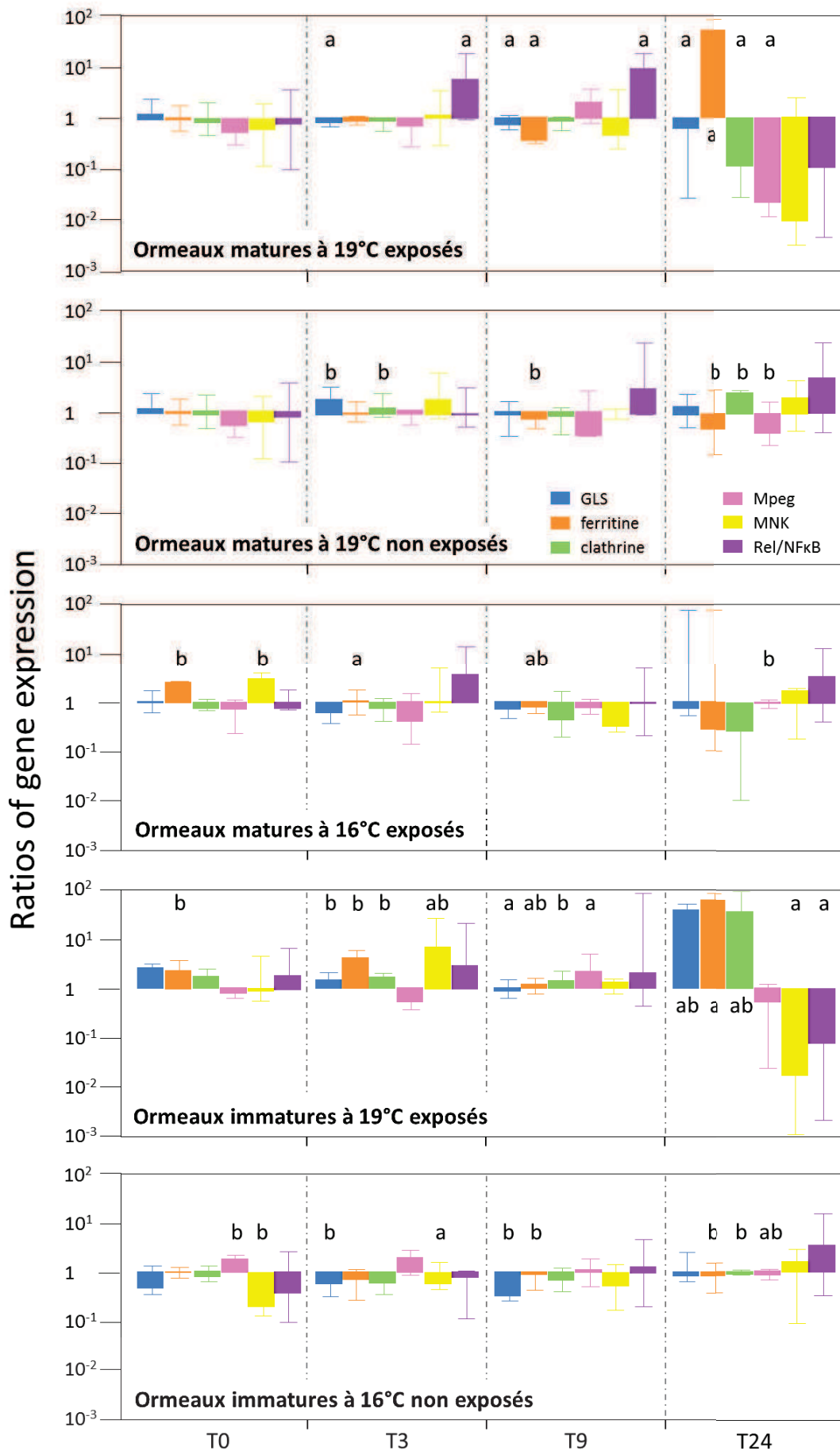
L'expression du gène de la ferritine est significativement plus faible chez les individus immatures non exposés à *V. harveyi* à 16°C, alors que celles des gènes de la clathrine et de la Mpeg sont significativement plus fortes que chez les individus contrôles positifs.

Figure 51 : Expressions de gènes d'intérêt liés à la réponse immunitaire, lors des stades précoces de l'interaction entre *V. harveyi* et l'ormeau européen.

Les animaux sexuellement matures ou immatures exposés à 16 ou 19°C ont été mis en contact ou non avec le vibriion pathogène, et l'expression de gènes clés a été analysée par Real-time PCR sur 24h d'exposition. Les rectangles représentent la médiane de ratios d'expression de gènes calculés par la méthode de Pfaffl, 2001, en considérant le gène « Elongation Factor 2 » comme gène de référence, de 5 réplicats biologiques par condition et par temps. Les barres correspondent à l'étendue des 5 valeurs de ratios d'expression de gènes.

T0 : temps de prélèvement préalable à la mise en contact avec *V. harveyi* ; T3 : 3h post-contact ; T9 : 9h post-contact et T24 : 24h post-contact.

L'analyse statistique a été effectuée par l'application de tests de Wilcoxon, la limite de significativité des tests a été fixée à 0,05. Les différences entre une valeur d'expression de gènes en un temps donné et le temps T0 sont indiqués par la lettre « a », et entre une valeur d'expression de gènes en un temps donné et la valeur d'expression de gènes chez les ormeaux matures à 19°C exposés à *V. harveyi* au même temps par la lettre « b ».



Caractéristiques cellulaires des hémocytes

Les caractéristiques immunitaires et cellulaires des hémocytes de ces mêmes individus, à savoir la densité en hémocytes (DH), la viabilité des hémocytes (VH), l'indice de phagocytose et la production de H₂O₂ dans les hémocytes, ont été estimées par cytométrie en flux selon les méthodes décrites par Travers et collaborateurs (Travers *et al.*, 2008d) (Fig. 52).

La DH est modulée par le facteur temps d'exposition chez les ormeaux exposés à *V. harveyi* à 19°C indépendamment de leur stade de maturité sexuelle. Une diminution significative est ainsi observée après 9h et 24h d'exposition chez ces individus, par rapport à T0. La DH après 24h d'exposition est significativement plus faible chez les contrôles positifs que chez les individus matures acclimatés à 19°C et non exposés à *V. harveyi*, et que chez les individus matures exposés à *V. harveyi* à 16°C.

La VH est modulée par le facteur temps d'exposition chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 16 et à 19°C et chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C. Une diminution significative de la VH est observée après 24h d'exposition chez les individus contrôles positifs, et après 3h d'exposition chez les individus matures exposés à *V. harveyi* à 16°C, par rapport à T0. Après 24h d'exposition, la VH est significativement plus faible chez les individus contrôles positifs que chez les individus matures acclimatés à 19°C et non exposés à *V. harveyi*, et que chez les individus immatures acclimatés à 16°C et non exposés à *V. harveyi*.

L'indice de phagocytose est modulé par le facteur temps d'exposition chez les ormeaux contrôles positifs. Une diminution significative de l'indice de phagocytose est observée après 9h et 24h d'exposition chez ces individus, par rapport à T0. Après 24h d'exposition, l'indice de phagocytose est significativement plus élevé chez les individus matures acclimatés à 19°C et non exposés à *V. harveyi*, et chez les individus immatures acclimatés à 16°C et non exposés à *V. harveyi*, que chez les ormeaux contrôles positifs.

La production de H₂O₂ est modulée par le facteur temps d'exposition chez les ormeaux contrôles positifs, chez les ormeaux matures acclimatés à 19°C et non exposés *V. harveyi*, et chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C. Une diminution significative de la production de H₂O₂ est observée après 9h et 24h d'exposition chez les individus matures acclimatés à 19°C exposés ou non à *V. harveyi*, et après 24h d'exposition chez les ormeaux

immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0. La production de H₂O₂ est significativement plus forte chez les individus matures acclimatés à 19°C et non exposés à *V. harveyi* par rapport aux individus contrôles positifs.

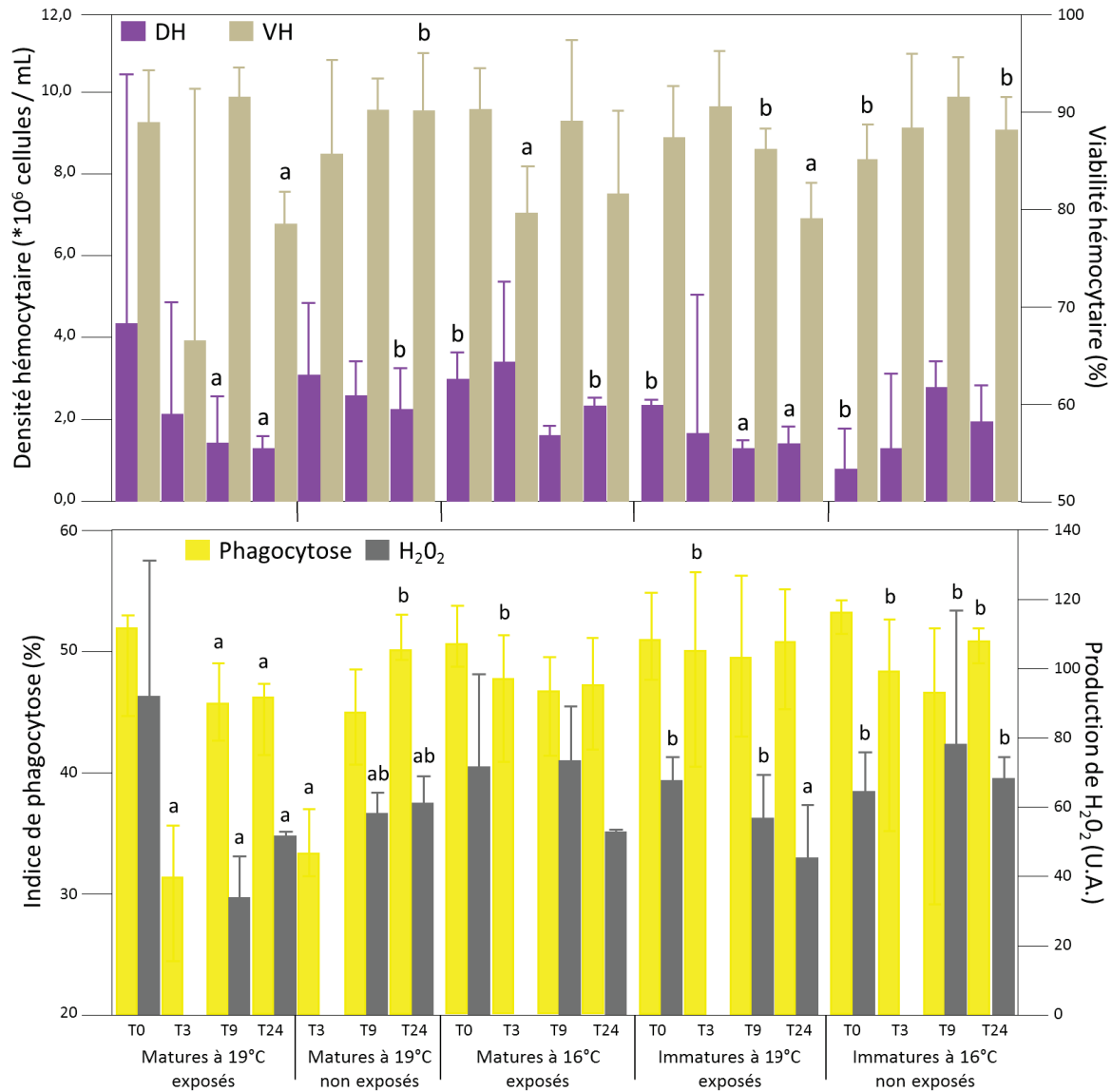


Figure 52 : Caractéristiques cellulaires des hémocytes d'ormeaux, lors des stades précoces de l'interaction avec *V. harveyi*.

Les animaux sexuellement matures ou immatures exposés à 16 ou 19°C ont été mis en contact ou non avec le vibrion pathogène, et la densité hémocytaire (DH), la viabilité hémocytaire (VH), l'indice de phagocytose et la production en H₂O₂ ont été mesurées par cytométrie en flux, sur 24h d'exposition. Les rectangles représentent la médiane et les barres correspondent à l'étendue des mesures hémocytaires de 5 ormeaux par condition et par temps.

T0 : temps de prélèvement préalable à la mise en contact avec *V. harveyi* ; T3 : 3h post-contact ; T9 : 9h post-contact et T24 : 24h post-contact.

C- Discussion générale

1. Réponses des hémocytes lors des stades précoces de l'interaction entre *V. harveyi* et l'ormeau européen

La première partie de ce chapitre visait à mettre en évidence la réponse des hémocytes lors des stades précoces de la vibriose chez l'ormeau européen, i.e. dans les premières heures après la mise en contact avec *V. harveyi*. A cette fin, les caractéristiques cellulaires, la réponse transcriptomique et la variabilité d'activités enzymatiques d'ormeaux acclimatés à 19°C et exposés ou non à *V. harveyi* ont été analysées après 3h, 9h et 24h d'exposition (Tableau 14).

Tableau 14 : Réponse des hémocytes d'ormeaux européens après 3h, 9h et 24h d'exposition à *V. harveyi*, en balnéation à 19°C, par rapport à des ormeaux non exposés prélevés en même temps.

DH : densité en hémocytes, VH : viabilité des hémocytes, H₂O₂ : production en peroxyde d'hydrogène, et IP : indice de phagocytose. Les gènes modulés sont annotés par le nom de la protéine associée.

	3h	9h	24h
Caractéristiques cellulaires	Pas de changement	↘ DH ↘ H ₂ O ₂	↘ DH ↘ VH ↘ H ₂ O ₂ ↘ IP
Caractéristiques transcriptomiques	↘ clathrine	↘ GLS ↘ ferritine ↘ clathrine ↗ Rel/NfκB ↗ Mpeg	↘ GLS ↗ ferritine ↘ clathrine ↗ Rel/NfκB ↗ Mpeg
Caractéristiques enzymatiques	Pas de changement	Pas de changement	↘ activité GLS ↘ activité CCO ↘ activité SOD

Des vibrions pathogènes ont pu être détectés, par Q-PCR, dès 9h d'exposition dans l'hémolymphe d'ormeaux exposés à *V. harveyi*. Dans cette étude, une corrélation positive a pu être établie entre l'intensité de la réponse hémocytaire et la concentration en *V. harveyi* dans l'hémolymphe.

Le développement de la vibriose chez l'ormeau européen induit une réduction de l'ensemble des paramètres cellulaires mesurés, à savoir la densité en hémocytes, leur viabilité, leur capacité de phagocytose et leur production en peroxyde d'hydrogène dès les premières heures d'exposition (Fig. 1). L'altération de la capacité de phagocytose des hémocytes d'ormeaux européens en contact avec *V. harveyi* a été précédemment évoquée par Travers et collaborateurs (Travers *et al.*, 2009b). Cette observation est confortée par la réduction de l'expression d'un gène impliqué dans l'internalisation des particules étrangères dans les cellules, à savoir la clathrine, dès 3h d'exposition.

Par ailleurs, une diminution de l'expression du gène de la GLS, et de l'activité de la GLS et de la CCO est observée après 24h d'exposition, par rapport aux individus non exposés à *V. harveyi* et aux individus prélevés avant la mise en contact (T0). Cette observation suggère que le métabolisme général des hémocytes d'ormeaux est affecté par l'invasion des vibrions pathogènes dans l'hémolymphe.

L'analyse transcriptomique a également permis de révéler des différentiels d'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire entre des ormeaux exposés ou non à *V. harveyi* et au cours du temps d'infection. Ainsi une augmentation de l'expression de la ferritine est significative dès 9h d'exposition chez les ormeaux, ce qui suggère leur stratégie de limitation de la biodisponibilité en nutriments essentiels à la croissance des vibrions pathogènes et/ou de la production de ROS cytotoxiques générés lors de la réaction de Fenton (Fenton et Jackson, 1899).

Le contact avec *V. harveyi* semble également influencer la synthèse d'effecteurs du système immunitaire par les hémocytes dès les premières heures de l'interaction avec l'ormeau européen, tel que cela est souligné par la réduction significative de l'expression du gène codant pour une perforine potentielle, la Mpeg, après 24h d'exposition. Une réduction de la transcription du gène du Rel/NFκB est également significative après 24h d'exposition, suggérant ainsi une potentielle perturbation de la transduction du signal de reconnaissance immunitaire *via* la voie Rel/NFκB lors de l'invasion par *V. harveyi*.

Ces résultats suggèrent que l'infection par *V. harveyi* altère le fonctionnement des hémocytes, au niveau cellulaire et moléculaire, dès les stades précoces de l'interaction, et plus particulièrement dès que le vibron pathogène est présent en concentration non négligeable dans l'hémolymphe. En cette altération potentielle de la réponse immunitaire

pourrait résider l'essentiel de la stratégie de virulence de *V. harveyi* chez l'ormeau européen dès l'étape de pénétration dans le système circulatoire, et pourrait expliquer son succès infectieux.

2. Découplage des facteurs température, maturité sexuelle et l'exposition à *V. harveyi* sur le métabolisme branchial et la réponse immunitaire de l'ormeau européen

La seconde partie de ce chapitre avait pour objectif de mieux comprendre l'impact sur la physiologie de l'ormeau propre à l'interaction avec *V. harveyi*. A cette fin, le découplage des paramètres température, maturité sexuelle et exposition au vibriion pathogène a été entrepris à l'échelle moléculaire et cellulaire au niveau de la voie d'entrée présumée, à savoir le complexe branchies-glande hypobranchiale et au niveau du système immunitaire.

L'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la respiration cellulaire et dans la réponse au stress au niveau des branchies a révélé :

1/ une augmentation significative de l'expression du gène de la sous-unité F0 de l'ATP synthase après 6h d'exposition chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* indépendamment de leur température d'acclimatation, par rapport à T0. L'ATP synthase est un complexe protéique enzymatique et membranaire, dont le rôle est la synthèse de l'ATP à partir du gradient électrochimique de protons notamment généré au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chi et Pizzo, 2006; Devenish *et al.*, 2008). L'observation de l'augmentation de la transcription de ce gène au cours des stades précoces de l'interaction suggère un accroissement de la demande énergétique chez les ormeaux matures au niveau branchial. L'importance de la synthèse de sous-unité de l'ATP synthase a été également mise en évidence lors d'infection de crevettes *Penaeus monodon* par *V. harveyi* (Chaikeeratisak *et al.*, 2012).

2/ une augmentation significative de l'expression du gène de la hsp71 au cours des premières heures d'exposition chez les ormeaux exposés à *V. harveyi*, indépendamment de la température d'acclimatation et de leur stade de maturité sexuelle. Les HSP sont des protéines chaperonnes largement conservées au sein du vivant et dont la synthèse peut être

induite en réponse au stress cellulaire, à l'élévation des températures, aux lésions tissulaires, aux infections, etc... (Schlesinger, 1990; De Maio, 1999). Généralement classées selon leur poids moléculaire, l'implication des HSP dans la réponse au stress a également été rapportée chez des mollusques marins (pour revue Gourdon *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 2001). Le gène codant pour la hsp71 a été identifié et caractérisé chez *H. tuberculata* par Farcy et collaborateurs (Farcy *et al.*, 2007). D'après les résultats présentés ici, l'exposition à *V. harveyi* semble induire la synthèse de cette protéine, au niveau des branchies de l'ormeau européen, dès les premiers stades de l'interaction.

3/ une augmentation significative de l'expression du gène de la TPx dès les premières heures d'exposition chez les animaux exposés à *V. harveyi*, indépendamment de la température d'acclimatation et de leur stade de maturité sexuelle. Les thioredoxine-peroxydases ou peroxiredoxines sont des protéines cellulaires impliquées dans l'équilibre oxydatif et la détoxification des composés peroxydés et du peroxyde d'hydrogène (pour revue Shuvaeva *et al.*, 2009). Ces protéines préviennent donc l'accumulation de tels composés moléculaires préjudiciables pour les cellules, notamment parce qu'ils participent à la formation de radicaux hydroxyles cytotoxiques par la réaction de Fenton (Fenton et Jackson, 1899). Ces composés radicalaires peuvent provoquer un véritable stress oxydatif dans les cellules lorsqu'ils ne sont pas dégradés, par modification irréversible des molécules biologiques (acides nucléiques, protéines) et initiation de réactions de peroxydation des acides gras insaturés. Récemment, le rôle des TPx a également été déterminé dans la signalisation cellulaire et la réponse immunitaire (Cox *et al.*, 2010; Ishii *et al.*, 2012). Ainsi l'exposition à *V. harveyi* semble activer la transcription du gène de la TPx chez l'ormeau européen, tel que cela a déjà été mis en évidence chez l'ormeau *H. discus discus* soumis à une infection multiple de trois souches bactériennes de *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus*, et *Listeria monocytogenes*. Cette augmentation de l'expression du gène de la TPx pourrait indiquer la nécessité d'équilibrer la présence accrue de molécules réactives de l'oxygène.

L'étude de l'expression de gènes au niveau des branchies d'ormeaux a donc permis de spécifier la réponse des ormeaux face à une exposition à *V. harveyi* lors des premières heures d'exposition. **Il semble ainsi que le développement de la vibriose chez l'ormeau européen soit caractérisé par une demande énergétique accrue, le déclenchement d'une réponse au stress et une nécessité d'équilibrer la balance oxydative.** Afin de vérifier ce

dernier point, l'activité d'enzymes anti-oxydantes a été mesurée chez ces mêmes individus. La mesure de l'activité de la SOD et de la GST couplée à celle de la GLS et de la CCO, a permis d'estimer l'impact propre de l'exposition au vibrion pathogène sur le métabolisme général, respiratoire et la réponse au stress oxydant des ormeaux européens :

1/ l'activité de la GLS augmente significativement chez les ormeaux acclimatés à 19°C et exposés au vibrion pathogène indépendamment de leur stade de maturité sexuelle après 9h d'exposition, par rapport à T0. Ce résultat suggère le concours de la température et de la présence de *V. harveyi* dans l'augmentation potentielle du métabolisme général au niveau des branchies des ormeaux.

2/ l'activité de la CCO augmente également, de manière significative, au cours des premières heures de mise en contact chez les ormeaux exposés à *V. harveyi* indépendamment de la température d'acclimatation et de leur stade de maturité sexuelle, par rapport à T0. Ce résultat indique une recrudescence potentielle de la respiration cellulaire au niveau branchial, chez les animaux exposés au vibrion pathogène.

3/ l'activité de la GST augmente significativement chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 19°C après 24h d'exposition par rapport à T0. Les glutathion-transférases sont des enzymes qui réduisent le glutathion en composés apolaires à atome électrophile. Les GST sont impliquées dans la défense cellulaire contre les xénobiotiques lipophiles et dans la réponse au stress oxydatif (Hayes *et al.*, 2005). L'oxydation des macromolécules biologiques lors d'un stress oxydatif génère la production de sous-produits cytotoxiques, qui sont donc dégradés par des enzymes cataboliques de type déshydrogénase, glutathion-peroxydase et GST. L'augmentation de l'activité de GST ou de l'expression de gènes codant pour des GST a été préalablement rapportée dans divers tissus de mollusques marins mis en contact avec des vibrions pathogènes, tels que la moule *Mytilus galloprovincialis* après 3h d'injection d'une suspension de *V. splendidus* ou *V. anguillarum*, la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* après 3h d'injection d'une suspension de *V. tapetis* et l'ormeau *H. discus discus* après 24h d'injection d'une suspension de trois souches bactériennes de *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus*, et *Listeria monocytogenes* (Canesi *et al.*, 2010; De Zoysa *et al.*, 2011; Umasuthan *et al.*, 2012).

4/ une augmentation significative de l'activité de la SOD chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 16 ou 19°C après 3h d'exposition et chez les ormeaux immatures exposés à *V.*

harveyi après 9h d'exposition, par rapport à T0. Le panel d'enzymes antioxydantes comprend notamment les superoxydes dismutases qui convertissent les molécules radicalaires superoxydées en molécules de dioxygène ou en peroxydes d'hydrogène (Fridovich, 1997).

L'augmentation de l'activité d'enzymes impliquées dans la réponse oxydative, chez des ormeaux exposés au vibron pathogène, suggère que *V. harveyi* peut induire un stress oxydatif au niveau des branchies, dès les premières heures de l'interaction. L'augmentation du taux de peroxydation lipidique mesuré corrobore cette hypothèse chez les ormeaux exposés à *V. harveyi* à 19°C indépendamment de leur stade de maturité sexuelle.

Cette analyse enzymatique nous permet donc de prédire que l'exposition à *V. harveyi* accroît le métabolisme général, le processus de respiration cellulaire et induit un stress oxydatif au niveau de branchies d'ormeaux européens.

L'analyse de l'expression de gènes dans les hémocytes a, par ailleurs, révélé :

1/ une diminution significative de l'expression du gène codant pour la GLS dès 9h d'exposition chez les ormeaux sexuellement matures exposés à *V. harveyi* à 19°C alors que ce gène est d'abord sous exprimé après 9h d'exposition puis surexprimé après 24h d'exposition chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0. Le métabolisme de la glutamine peut être particulièrement altéré lors d'un processus infectieux (Wilmore et Shabert, 1998; Karinch *et al.*, 2001), et l'expression du gène GLS est généralement un marqueur du métabolisme général dans les études transcriptomiques. Ce résultat suggère qu'à 19°C, l'exposition au vibron pathogène pourrait ainsi modifier le métabolisme général dans les hémocytes d'ormeaux européens.

2/ une augmentation significative de l'expression du gène codant pour la ferritine après 24h d'exposition chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 19°C et après 3h et 24h chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0. Tel que cela a déjà été évoqué précédemment, la ferritine est une protéine qui intervient dans l'homéostasie du fer et limite ainsi la production de molécules réactives de l'oxygène et la disponibilité en fer nécessaire à la croissance des espèces *Vibrio*. Ce résultat suggère donc que des ormeaux exposés au vibron pathogène tendent à limiter la biodisponibilité en fer dans le système circulatoire.

3/ une diminution significative de l'expression du gène codant pour la clathrine après 24h d'exposition chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 19°C alors que l'expression de ce gène augmente au même temps chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0. La clathrine est une protéine impliquée dans l'internalisation assurée par les cellules phagocytaires (Veiga et Cossart, 2006; Pauly et Drubin, 2007). Chez les ormeaux, la capacité de phagocytose conditionne la résistance aux maladies infectieuses (Hooper *et al.*, 2007a). Une diminution de l'expression de la clathrine pourrait donc être préjudiciable dans l'accomplissement du processus de phagocytose chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 19°C.

4/ une diminution significative de l'expression du gène codant pour la MEP après 24h d'exposition chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 19°C, telle que cela a été discuté dans l'article 4 de ce manuscrit.

5/ une tendance à la diminution de l'expression des gènes reliés à la transduction du signal, à savoir MNK et Rel/NFκB, après 24h d'exposition chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0. Cette tendance se révèle d'ailleurs significative, au même temps, chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C. Ces résultats pourraient témoigner d'une perturbation des voies de signalisation MAPK et Rel/NFκB suite à une exposition à *V. harveyi* chez des ormeaux acclimatés à 19°C.

La réponse hémostatique, à l'échelle transcriptomique, des ormeaux matures acclimatés à 19°C à une exposition à *V. harveyi* semble mettre en évidence une diminution du métabolisme général, une augmentation de l'expression de la ferritine et la diminution de l'expression de gènes codant pour des effecteurs immunitaires et des protéines impliquées dans la transduction du signal.

Les ormeaux immatures à 19°C présentent également une réponse transcriptomique face à une exposition à *V. harveyi*, bien qu'ils ne soient pas sensibles à la vibriose et que la bactérie pathogène n'ait été détectée dans l'hémolymphe de ces animaux. **Ces résultats suggèrent que la réponse hémostatique pourrait être modulée par la simple présence d'agents pathogènes dans l'environnement, sans que le cycle infectieux ne soit amorcé.**

L'étude des caractéristiques cellulaires des hémocytes d'ormeaux a également mis en évidence, dans cette étude :

1/ une diminution significative de la densité et de la viabilité hémocytaires chez les ormeaux exposés à *V. harveyi* à 19°C indépendamment de leur stade de maturité sexuelle après 24h d'exposition par rapport à T0. Une diminution de la viabilité est également significative après 3h d'exposition chez les ormeaux sexuellement matures exposés à *V. harveyi* à 16°C par rapport à T0. Ces résultats suggèrent une influence de l'exposition au vibron sur les caractéristiques cellulaires des hémocytes.

2/ une diminution significative de l'indice de phagocytose chez les ormeaux matures exposés à *V. harveyi* à 19°C, dès 9h d'exposition par rapport à T0 ; et une diminution significative de la production de H₂O₂ au cours de temps d'exposition, chez les ormeaux matures exposés ou non à *V. harveyi* à 19°C, et chez les ormeaux immatures exposés à *V. harveyi* à 19°C, par rapport à T0. Ces résultats suggèrent le concours de la température et de l'exposition à *V. harveyi* dans l'altération des capacités hémocytaires chez les ormeaux européens.

Ces résultats suggèrent une altération des fonctions hémocytaires lors d'une exposition à *V. harveyi* chez l'ormeau européen, essentiellement lorsqu'elle a lieu à 19°C, et ne permettent donc pas de prédire des capacités immunitaires potentielles de résistance au vibron pathogène chez les ormeaux sexuellement immatures. Or, une adhésion en masse de *V. harveyi* sur les tissus branchiaux de l'ormeau n'ont été observée ni chez des individus sexuellement immatures, ni chez des individus matures à 16°C. Ce constat tend à nous informer que la phase d'adhésion puis de pénétration de *V. harveyi* dans l'organisme-ormeau serait l'étape clé du cycle infectieux et conditionnerait la survie des ormeaux à l'exposition à *V. harveyi*, tel que cela a été évoqué précédemment dans ce manuscrit. Cependant, il peut être supposé que la présence de vibrons pathogènes dans le milieu induit une réponse hémocytaire chez les ormeaux immatures ou chez des ormeaux placés à des températures inférieures au seuil de déclenchement de la vibriose.

Conclusion générale et perspectives

I. Rappels des principaux résultats

Cette thèse visait à spécifier les modalités de déclenchement de la vibriose chez l'orveau européen du point de vue des conditions physiologiques de l'hôte – niveau d'expression de gènes, immunocompétences, etc... –, et des capacités de virulence de l'agent étiologique mis en cause, *V. harveyi*, en lien avec le facteur température et le déroulement du cycle infectieux.

L'ensemble des études réalisées a permis :

- de mettre en évidence les voies métaboliques potentiellement impactées par le développement de la vibriose chez l'orveau et de révéler des potentiels marqueurs génomiques de la résistance et de la sensibilité à la vibriose chez l'orveau ;
- de déterminer l'impact de conditions contraignantes – manipulation et exposition à l'air – sur la réponse transcriptomique et immunitaire de l'orveau et de démontrer que l'état physiologique global de l'orveau est un facteur prépondérant pour le déclenchement de la vibriose, en condition contraignante ;
- d'élargir et spécifier les limites de déclenchement de la vibriose chez l'orveau : prépondérance majeure de la température et sensibilité des orveaux physiologiquement déprimés ;
- de mettre au point une technique de quantification par RT-qPCR de *V. harveyi* dans les tissus d'orveau et de révéler la dynamique d'infection de *V. harveyi* chez l'orveau européen : voie d'entrée présumée, organes ciblés, etc... ;
- d'établir que la mesure de la concentration de *V. harveyi* dans l'hémolymphe d'orveau est un proxy de l'évolution du cycle infectieux et de l'intensité de la réponse hémocytaire ;
- de mieux comprendre l'influence de la température sur le déroulement du cycle infectieux et la virulence des souches de *V. harveyi* ;
- d'appréhender l'étude du génome de la souche ORM4, pathogène de l'orveau européen, et de révéler des facteurs de virulence potentiels ;
- de définir l'impact de l'exposition à *V. harveyi* sur les caractéristiques transcriptomiques et cellulaires des hémocytes d'orveau européen ;

- d'évoquer la probable influence de l'exposition à *V. harveyi* sur l'altération des fonctionnalités des hémocytes, l'inhibition de la synthèse d'effecteurs immunitaires et sur le processus global de transduction du signal par la voie NFκB et de s'interroger sur la possible influence de l'exposition à *V. harveyi* sur les caractéristiques des hémocytes, cellulaires et transcriptomiques, chez des ormeaux en conditions excluant le déclenchement possible de la vibriose (animaux sexuellement immatures ou acclimatés à 16°C).
- et enfin de caractériser l'impact de l'exposition à *V. harveyi* sur le métabolisme général, estimé au niveau de la voie d'entrée présumée : augmentation de la demande énergétique, déclenchement de la réponse au stress, genèse d'un stress oxydant.

II. Facteurs physiologiques propices au développement de la vibriose chez l'ormeau – Notion de sensibilité et de résistance

Les résultats obtenus rendent compte de capacités différentielles de la réponse d'ormeaux européens lors d'une exposition à *V. harveyi*, selon les conditions environnementales qui leur sont imposées et leurs caractères intrinsèques (Fig. 53, Tableau 15). L'ensemble de ces facteurs influe sur l'établissement de l'interaction, le devenir infectieux des ormeaux et leur survie.

Dans le premier cas de figure, l'ormeau n'est pas sensible à la maladie, soit parce qu'il est en condition thermique non favorable à la croissance de *V. harveyi* soit parce que son statut reproducteur, son état immunitaire et physiologique ou sa réponse à l'exposition au vibriion pathogène ne favorise pas le déclenchement de la vibriose. Dans le second cas de figure, l'ormeau succombe à la maladie soit parce qu'il est en condition favorable au développement de *V. harveyi* et à sa virulence, soit parce que ses conditions intrinsèques : immunodéfiance, stress, réponse inadéquate, etc... sont propices à l'initiation de l'interaction et au développement de la vibriose. A la lumière des résultats présentés dans ce

manuscrit, il apparaît que la capacité d'un ormeau à maintenir ou à stimuler la production de protéines impliquées dans la réponse au stress (par ex. ferritine, HSP84), l'immunité (par ex. MEP) et le métabolisme respiratoire (par ex. COX III) influence sa survie lors de l'exposition au vibron pathogène (Tableau 15).

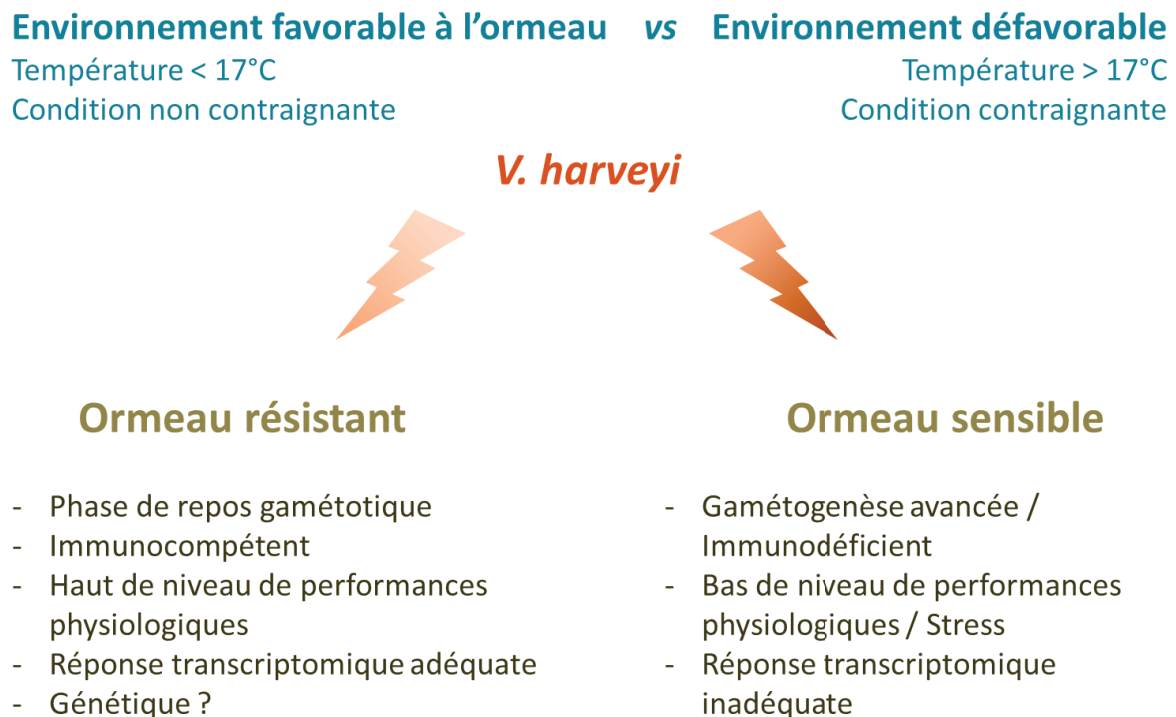


Figure 53 : Schéma récapitulatif des conditions de développement de la vibriose et les disparités phénotypiques observées entre les ormeaux sensibles et résistants.

Ce type de relation entre la présence de vibrions pathogènes et les capacités disparates de résistance à la vibriose chez des mollusques marins selon leurs conditions environnementales et physiologiques, est régulièrement mis en évidence, et a notamment été caractérisé chez les huîtres *C. gigas* lors de co-infections de *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, agents étiologiques présumés des mortalités estivales observées chez cette espèce (De Decker, 2010).

Tableau 15 : Réponse transcriptomique des ormeaux européens et mortalités observées après une exposition à *Vibrio harveyi*, selon les conditions imposées (stress induit) et leurs caractères de résistance à la vibriose.

= : pas de tendance observée dans la réponse transcriptomique par rapport aux témoins, - ou + : tendance à la diminution ou à l'augmentation de la transcription du marqueur génomique considéré par rapport aux témoins.

Mesures effectuées		Exposition à <i>V. harveyi</i>		Stress induit	
Marqueurs génomiques	Fonctions	Résistants	Sensibles	Manipulation	Air
GLS	Métabolisme général	=	-	-	=
COX III	Respiration cellulaire	+	=	-	=
ATPs FO	Métabolisme énergétique			+ ou - ^a	=
Ferritine	Immunité / Réponse au stress	+	-	-	-
HSP 84	Réponse au stress	+	-	-	-
MEP	Immunité			b	+
Mortalités observées		non	oui	oui	non

a : selon l'organe étudié, la stade de maturité sexuelle et la température d'acclimatation des ormeaux

b : selon la stade de maturité sexuelle et la température d'acclimatation des ormeaux

La plasticité phénotypique observée au sein d'une population d'ormeaux soumise à une exposition à *V. harveyi* suppose la part du déterminisme génétique dans la variabilité de la réponse des ormeaux. Cette question n'est pas abordée dans ce manuscrit, mais l'article 1 présente des marqueurs génétiques potentiels de la résistance ou sensibilité à la vibriose. A la lumière de ces résultats, des analyses du polymorphisme génétique de certains de ces marqueurs ont été entrepris par Anne-Leïla Meistertzheim afin de déterminer si la résistance à la vibriose chez l'ormeau européen peut être associée à des génotypes particuliers au

niveau individuel, et par Flavia Nunes afin de valider cette hypothèse sur des populations du milieu naturel montrant des taux différentiels de mortalités estivales. Ces travaux se réalisent en collaboration entre le LEMAR (C. Paillard et D. Moraga), la station de Biologie marine du MNHN (Concarneau -(V. Roussel), et l'université de Perpignan (S. Planes).

Par ailleurs, afin de compléter les résultats obtenus ici, à l'échelle moléculaire et cellulaire, des études des capacités physiologiques individuelles pourraient être menées afin d'estimer le coût physiologique de la résistance à la vibriose chez l'ormeau européen.

Enfin, l'avènement de l'ère de la méta-génomique et de la prise en compte de l'écologie microbienne d'un organisme dans l'accomplissement de ses fonctions physiologiques essentielles dont l'immunité et la résistance aux maladies, inspire actuellement les perspectives de recherche sur l'interaction entre l'ormeau européen et *V. harveyi* (Rosenberg et Ben-Haim, 2002; Dethlefsen *et al.*, 2007; Virgin, 2007; Haine, 2008). En effet, il pourrait ainsi être mis en évidence l'évolution de la microflore des ormeaux, la disparité géographique de cette microflore, et son rôle potentiel dans la résistance à la vibriose.

III. *V. harveyi* : un parasite virulent et opportuniste

Par « opportuniste », il est entendu la définition proposée par Combes, qui associe les capacités infectieuses d'un parasite lors de conditions défavorables pour son hôte (Combes, 2010). Au regard des résultats présentés dans ce manuscrit et précédemment acquis, *V. harveyi* semble profiter de conditions environnementales particulières ou intrinsèques aux ormeaux pour déclencher un processus infectieux (Fig. 54). La température semble notamment influencer la croissance de la souche incriminée et sa virulence, dont ses capacités d'adhésion et de pénétration. Par contre, lorsque le vibriion pathogène a pénétré les tissus de son hôte, l'influence de la température sur la poursuite du cycle infectieux semble être modérée.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis de révéler des différences transcriptomiques entre ormeaux résistants et sensibles à la vibriose, de vérifier l'importance de l'état physiologique des ormeaux et des conditions contraignantes dans le développement de la vibriose, de spécifier l'influence de la température dans la virulence de *V. harveyi* et dans l'accomplissement des étapes du cycle infectieux, d'établir la temporalité du cycle infectieux de *V. harveyi* chez l'ormeau européen, et enfin d'appréhender la réponse de l'ormeau européen lors d'une exposition à *V. harveyi*.

IV. Perspectives de recherche : vers des méthodes de lutte et la découverte de nouveaux agents pathogènes de l'ormeau

A-Des macroalgues bienfaitrices

Actuellement, la recherche de méthodes de lutte contre les espèces *Vibrio* pathogènes connaît un véritable essor, du fait de l'apparition de résistance aux antibiotiques chez ces espèces dans les structures aquacoles, et notamment chez *V. harveyi* (Karunasagar *et al.*, 1994; Kitiyodom *et al.*, 2010). Récemment, plusieurs études montrent l'intérêt de l'apport alimentaire ou de l'injection d'extraits de macroalgues sur les compétences immunitaires ou la résistance aux vibrioses chez des invertébrés marins. Des résultats concluants ont notamment été démontrés chez une espèce de crevette, *Litopenaeus vannamei*, qui fait l'objet d'élevage intensif en Amérique du Sud et en Asie occidentale et souffre régulièrement d'infections causées par *V. alginolyticus*. Un accroissement de paramètres immunitaires – densité en hémocytes, indice de phagocytose, activité de la phénoloxydase ou d'enzymes antioxydantes – et de la résistance à la vibriose a ainsi été observé, chez cette espèce, après l'apport alimentaire d'espèces de macroalgues telles que *Sargassum hemiphyllum*, *Gelidium amansii*, *Gracilaria tenuistipitata*, ou après l'injection d'extraits de ces algues, ou l'immersion dans une eau contenant une dose d'extraits algaux (Hou et Chen, 2005; Fu *et al.*, 2007; Huynh *et al.*, 2011; Sirirustananun *et al.*, 2011). Une amélioration notable de la résistance à la vibriose, causée par *V. harveyi*, a également été détectée, chez

une autre espèce de crevettes d'intérêt aquacole, *Penaeus monodon*, après l'administration d'extraits algaux issus des macroalgues *Gracilaria fisheri* et *Ulva fasciata* (Kanjana *et al.*, 2011; Selvin *et al.*, 2011).

Au laboratoire, des tests préliminaires de l'effet d'extraits polaires et apolaires de macroalgues du littoral breton sur la croissance de la souche ORM4 de *V. harveyi* ont été réalisés en collaboration avec Clémence Royer, actuellement doctorante (LEMAR, IUEM, UBO), et Valérie Stiger-Pouvreau (Fig. 55).

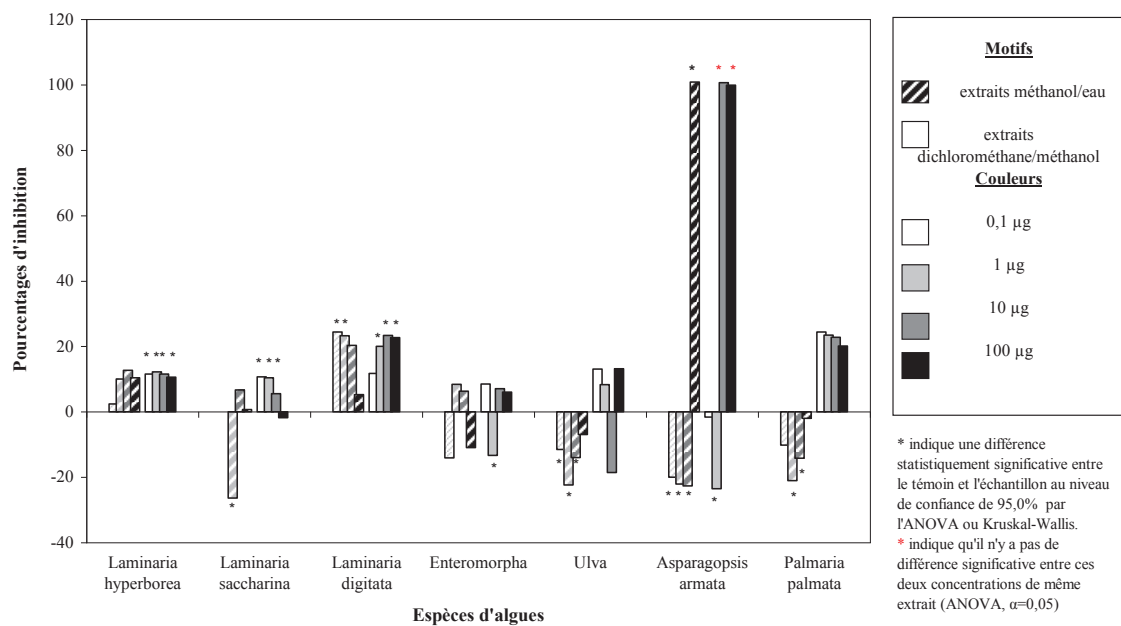


Figure 55 : Tests d'activités d'extraits algaux sur la croissance de *V. harveyi*, réalisés à la température et au temps d'incubation optimal de la souche (Royer, 2009).

Le pourcentage d'inhibition a été rapporté à la croissance de la souche en absence d'extraits algaux. L'extrait réalisé avec le solvant méthanol/eau est polaire ; l'extrait réalisé avec le solvant dichlorométhane/méthanol est apolaire.

Les résultats montrent notamment un effet inhibiteur significatif des extraits apolaires de laminaires et d'*Asparagopsis armata*. L'administration ou l'injection de tels extraits pourrait être ensuite réalisée *in vivo*, afin d'évaluer leur influence sur la résistance à la vibriose ou les compétences immunitaires, chez l'ormeau européen. Ces travaux se poursuivent actuellement en collaboration avec Nuria Garcia Bueno du laboratoire « Mer Molécules Santé » de l'Université de Nantes et feront l'objet d'une publication future.

Les recherches sur de possibles méthodes de lutte contre la vibriose de l'ormeau européen pourraient s'étendre à la mise au point et l'utilisation de probiotiques. Plusieurs études montrent, en effet, l'intérêt de ces compléments sur la survie, la croissance ou la digestion chez différentes espèces d'*Haliotis*, notamment *H. gigantea*, *H. midae* et *H. rufescens* ; ou l'inhibition de la croissance d'espèces *Vibrio* pathogènes à l'origine de mortalités chez les ormeaux, telles que *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* (Macey et Coyne, 2005; ten Doeschate et Coyne, 2008; Iehata *et al.*, 2009; Silva-Aciares *et al.*, 2011).

B- Mortalités inexplicées d'ormeaux européens : un nouveau parasite ?

Depuis l'été 2010, des mortalités inexplicées d'ormeaux ont été observées en fermes aquacoles et au laboratoire, indépendamment de la température de l'eau et de leur stade de maturité sexuel. Ces ormeaux présentent des boursoufflures, parfois très étendues, et des pustules au niveau du muscle pédieux, et souffrent de léthargie (observation personnelle). Aucune lésion coquillière n'a pu être observée. Des analyses préliminaires effectuées sur des animaux issus d'écloserie, au laboratoire, ont permis :

1/ de détecter la très faible abondance de particules virales dans l'hémolymphe des ormeaux souffrant acclimatés à 16°C ;

2/ de vérifier que la cause probable des mortalités est d'origine bactérienne. En effet, l'injection d'échantillons d'hémolymphe filtrée à 0,2 µm chez des ormeaux sains n'entraîne pas de mortalités contrairement aux échantillons non filtrés ;

3/ d'isoler 232 souches bactériennes à partir d'échantillons d'hémolymphe ou de boursoufflures tissulaires présentant les signes précédemment cités. Parmi ces souches, 79% ont été affiliées au genre *Vibrio* et 47% à l'espèce *V. harveyi* dont 74% d'entre elles possèdent le plasmide de virulence de la souche ORM4, pVCR1, après détection en PCR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques adéquates (Conejero et Hedreyda, 2003; Liu *et al.*, 2006; Travers *et al.*, submitted). Ces résultats préliminaires montrent la prévalence de la souche ORM4 de *V. harveyi* au sein des ormeaux souffrants, y compris ceux considérés comme sexuellement immatures et ceux immergés dans une eau à 16°C. Des études

supplémentaires de type discrimination génétique de l'ensemble des souches et d'analyse de la biodiversité microbienne entre les températures d'acclimatation des ormeaux, par exemple par technique de RFLP, couplées à des infections expérimentales pourraient permettre d'établir le lien entre une ou plusieurs de ces souches et les mortalités observées. Ces analyses permettraient de vérifier si ces mortalités pourraient être attribuées soit à une souche de *V. harveyi* ayant évolué et capable d'infecter des animaux à des températures inférieures à 17°C indépendamment de leur stade de maturité sexuelle, soit à une autre espèce bactérienne qui n'est à ce jour pas connue pour sa pathogénicité chez l'ormeau européen.

Annexes

Annexe 1 : Méthodologie

A- Les expérimentations *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* sont généralement nécessaires dans l'étude des interactions hôte-parasite afin de compléter les tests *in vitro* qui ne prennent pas en compte l'environnement et la multitude des mécanismes de la défense de l'hôte (Gyles, 2011). L'échantillonnage de matériel biologique permet alors d'examiner les processus de l'interaction à un moment précis. Une méthode de reproduction de la maladie en routine peut alors sembler primordiale dans l'étude de l'interaction en milieu contrôlé. Par ailleurs, la création ou modification de souches bactériennes pathogènes (mutations génomiques, insertion plasmidique, etc...) peut également aider l'observation des organes-hôtes ciblés, et la compréhension des stratégies de virulence.

Ce type d'expérimentation pose, cependant, le souci de la disponibilité en organisme-hôtes et nécessite soit des campagnes d'échantillonnage en milieu naturel, soit l'approvisionnement par des structures d'élevage.

Les expérimentations animales menées dans les études présentées dans ce manuscrit ont été permises grâce à la collaboration avec la structure aquacole *France Haliotis* et Sylvain Huchette. Les ormeaux utilisés ont été transférés depuis cette structure vers les salles d'acclimatation du laboratoire LEMAR, à sec, dans des contenants en polystyrène garnis de macroalgues *Palmaria palmata*. Dès l'arrivée au laboratoire, les animaux ont ensuite été disposés dans des seaux d'un volume de 5L emplis d'eau de mer oxygénée, filtrée et remplacée quotidiennement. Pour les expériences d'infections expérimentales, l'eau des seaux a été maintenue à 16°C, température inférieure au seuil de déclenchement de la vibriose chez l'ormeau européen, ou majorée d'un degré celsius par jour jusqu'à atteindre 19°C, température supérieure au seuil de déclenchement de la vibriose chez l'ormeau européen (Tarvers *et al.*, 2009a). Généralement, les ormeaux ont été maintenus à cette température pendant au moins une semaine avant de procéder à l'infection expérimentale.

B- Les études génomiques et transcriptomiques

Les méthodes génomiques sont des outils très précieux dans l'étude des bases moléculaires de processus biologiques, tels que la résistance à des maladies ou la réponse au stress. La première méthode génomique employée dans les études des interactions entre invertébrés marins et leurs parasites visait à décrire les gènes impliqués dans la fonction immunitaire, par homologie de séquence (pour revue Romero *et al.*, 2012). Cependant cette approche ne pouvait, dans un premier temps, qu'être limitée du fait du peu d'information disponible sur les gènes de ces espèces dans les données diffusées. Sont apparues alors des techniques empruntées aux recherches médicales de description des gènes différentiellement exprimés entre deux populations d'organismes, telles que les collections de séquences génomiques par création de banques d'ADNc³¹ ou la technique des banques soustractives (Zhang et Chai, 1995; Diatchenko *et al.*, 1996). Ces méthodes ont notamment été utilisées dans le but de révéler des gènes clés liés à la résistance à des maladies infectieuses, qui pourraient ainsi être des marqueurs de la sélection. Ces banques de séquences génomiques permettent également l'identification de gènes impliqués dans diverses fonctions biologiques, notamment chez des organismes pour lesquels peu de données sont disponibles.

D'autres techniques ont été développées récemment, notamment celles en lien avec le séquençage haut-débit et la construction de puces à ADN (« microarrays ») et permettent d'acquérir des informations supplémentaires et plus complètes sur les interactions biologiques (Shalon *et al.*, 1996; Schuster, 2008). Elles nécessitent cependant un coût non négligeable dans le cadre d'études écologiques et une technicité avancée dans le traitement des données acquises.

Les études génomiques menées ici se sont focalisées sur la mesure de l'expression de gènes différentielle ou comparative entre différents groupes d'ormeaux : ormeaux résistants vs sensibles vs non exposés au vibron pathogène, ormeaux stressés vs ormeaux non stressés, et ormeaux exposés au vibron pathogène au cours du développement de l'infection. Dans cette perspective, la méthodologie employée s'appuie sur les étapes suivantes : 1/ échantillonnage, 2/ extraction des molécules d'intérêt et 3/ mesure par Q-PCR.

³¹ Brin nucléotidique complémentaire de l'ARN messager produit naturellement dans la cellule.

Echantillonnage

Systématiquement, l'échantillonnage a été réalisé en condition stérile, avec soin de limiter les contaminations entre échantillons. Avant dissection, l'hémolymphe des ormeaux a été prélevée, mise en tube eppendorf, annotée et stockée à froid. Les ormeaux ont ensuite été fixés dans l'azote liquide et stockés à -80°C avant dissection. Les organes d'intérêt ont été prélevés en condition stérile en chambre froide et sur glace. Chaque organe est alors pesé, mis en tube, annoté et stocké à froid avant extraction des molécules d'intérêt.

Extraction des molécules d'intérêt

Les ARN ont été extraits en utilisant le produit de réaction Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) selon les instructions du fournisseur, et resuspendus ensuite dans un volume de 50µL d'eau pure RNAase free. La quantité des ARNs extraits a été mesurée systématiquement par spectrophotométrie à l'aide de l'appareil Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher scientific, USA), et leur qualité estimée sur gel d'agarose 1% et après analyse à l'aide de l'appareil Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). La transcription inverse des ARN a été réalisée à l'aide du kit RevertAid™ (Fermentas International Inc., Burlington, Canada) et la contamination en molécules d'ADN dans les échantillons initiaux a été estimée par amplification différentielle entre l'échantillon initial et l'échantillon contenant les produits de la transcription inverse.

Mesure en Q-PCR

La mesure de l'expression de gènes d'intérêt a été effectuée par Q-PCR à l'aide de l'appareil 7300 real-time PCR system (AppliedBiosystems, Foster City, CA), par quantification relative en utilisant le produit de réaction SybrGreen ROX Mix (AB gene, UK). La séquence des amorces utilisées pour l'amplification a été dessinée à l'aide du logiciel Primer express (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'analyse a été réalisée à partir d'un échantillon de réaction dilué au 100è dans un volume total de 10 µL en considérant les concentrations en réactifs suivants : 1X 1XAbsolute QPCR SYBRGreen et 70nM de chaque amorce.

RT-qPCR measurements were done as described in Travers *et al.* (Travers *et al.*, 2010). Each run included a negative control in which sterile water replaced cDNA sample, and a reference sample (control) which was made up of a pool of all the samples. Results are presented as changes in relative expression normalized to the reference gene using the method described by Pfaffl (Pfaffl, 2001) and determined by the equation:

Relative expression = $E_{\text{target}}^{\Delta C_{\text{ttarget}}(\text{control-sample})} / E_{\text{ref}}^{\Delta C_{\text{tref}}(\text{control-sample})}$, where E_{target} is the amplification efficiency of the target or gene of interest, E_{ref} is the amplification efficiency of the reference gene and C_t is the cycle threshold.

C- L'immunologie

La méthode la plus couramment utilisée afin d'estimer la magnitude et l'efficacité de la réponse immunitaire d'un organisme, i.e. estimer son immunocompétence, face à son parasite ou lors de conditions contraignantes est de mesurer un ou plusieurs paramètres de ce système immunitaire. Cependant, la corrélation entre les mesures immunitaires et la résistance à une maladie infectieuse ou à une condition contraignante est complexe notamment parce que cette relation dépend du parasite considéré et parce que la variation des paramètres immunitaires ne prédit pas une réaction positive ou négative, juste ou inappropriée face à un parasite ou à des facteurs contraignants (Oliver et Fisher, 1999; Adamo, 2004). Ainsi le choix des paramètres immunitaires doit être une étape importante en immunologie et tout résultat acquis devrait être mis en relation avec des données physiologiques, écologiques, microbiologiques, etc..., afin de compléter l'étude.

Des techniques empruntées à chacune de ces méthodes ou domaine de recherche ont été utilisées au cours de ce travail de thèse.

Annexe 2 : Valorisation des travaux de thèse

1- Les effets de l'exposition à l'air et de la manipulation sur la réponse transcriptomique, immunitaire et sur la sensibilité à la vibriose chez l'ormeau *Haliotis tuberculata*

Communication orale – Congrès national *Immuninv*, Perpignan, France – Oct. 2012

2- La vibriose chez l'ormeau européen

Communication orale et Poster – Doctoriales de Bretagne, Landerneau, France – Déc. 2011

3- Quantification methods of a pathogenic strain of *Vibrio harveyi* in the abalone *Haliotis tuberculata* and route of entry in the host

Poster - Congrès international *Vibrio*, Copacabana, Brésil – Nov. 2009

4- Emergence de maladies chez les animaux marins avec le réchauffement climatique : cas de la vibriose de l'ormeau européen

Communication orale – Forum des doctorants de la Mer, Brest, France – Avril 2009

5- Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the abalone *Haliotis tuberculata* in response to a bacterial challenge by *Vibrio harveyi*

Communication orale – Congrès international *Physiomar*, Brest, France – Sept. 2008

Annexe 3 : Activités annexes

1- Activité d'encadrement

- Janvier à Mars 2009 : co-encadrement de Mlle Clémence Royer – stage de M1 Sciences Biologiques Marines, UBO – Interaction sympatrique entre *Vibrio harveyi* et différentes espèces de macro-algues du littoral breton
- Mars 2009 à Juin 2009 : encadrement de Mlle Coralie Alain – stage de M1 IUP Génomique et Protéomique, Université de Lille – Mise en évidence de la voie d'entrée de *Vibrio harveyi* chez l'ormeau européen
- Janvier à Mars 2010 : encadrement de Mlle Emilie Baugin – stage de M1 Sciences Biologiques Marines, UBO – Influence de la température sur l'état immunitaire de l'ormeau *Haliotis tuberculata*
- Janvier à Mars 2012 : encadrement de M. Clément Offret – stage de M1 Sciences Biologiques Marines, UBO – Influence de l'exposition à l'air et de la manipulation sur la réponse transcriptomique de l'ormeau européen

2- Vacataire d'Enseignement

- Unité d'Enseignement de Biologie Animale – L1 Biologie, UBO – 192h TP réparties sur les années universitaires 2008-2009, 2010-2011 et 2011-2012
Responsable des enseignements : Jacques Baron et Yves-Marie Paulet.
- U.E. de Génétique – L2 Biologie, UBO – 66h TP réparties en les années universitaires 2009-2010, 2010-2011 et 2011-2012.
Responsable des enseignements : Gilbert Charles et Dario Moraga.
- U.E. Réponse au stress chez les organismes marins – M2 Sciences Biologiques Marines, UBO – 14h TD/TP réparties en les années universitaires 2010-2011 et 2011-2012.
Responsable des enseignements : Dario Moraga.

3- Activité associative

Présidente de l'association des jeunes chercheurs de la Mer, MerSciDoc, de déc. 2008 à mars 2010. Membre d'honneur de l'association depuis.

Bibliographie

A

- Adamo SA. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour* 68:1443-1449.
- Adema CM, Vandeutekomulder EC, Vanderknaap WPW, Meuleman EA, Sminia T. 1991. Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnialis* in relation to the rate of phagocytosis. *Developmental and Comparative Immunology* 15:17-26.
- Aguirre-Guzman G, Lara-Flores M, Sanchez-Martinez JG, Campa-Cordova AI, Luna-Gonzalez A. 2012. The use of probiotics in aquatic organisms: A review. *African Journal of Microbiology Research* 6:4845-4857.
- Ajitha S, Sridhar M, Sridhar N, Bright Singh IS, Varghese V. 2004. Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus (Fenneropenaeus) indicus* (H. Milne Edwards). *Asian Fisheries Science* 17:71-80.
- Alavandi SV, Manoranjita V, Vijayan KK, Kalaimani N, Santiago TC. 2006. Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. *Letters in Applied Microbiology* 43:566-570.
- Allam B, Paillard C & Ford SE (2002) Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 221-231.
- Allam B, Ford SE. 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 20:374-383.
- Alm RA, Manning PA. 1990. Characterization of the HylB gene and its role in the production of the El-Tor hemolysin of *Vibrio cholerae* O1. *Molecular Microbiology* 4:413-425.
- Alsina M, Blanch AR. 1994a. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76:79-85.
- Alsina M, Blanch AR. 1994b. Improvement and update of a set of a keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 77:719-721.
- Altstatt JM, Ambrose RF, Engle JM, Haaker PL, Lafferty KD, Raimondi PT. 1996. Recent declines of black abalone *Haliotis cracherodii* on the mainland coast of central California. *Marine Ecology Progress Series* 142:185-192.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*. 2004. 64:5245-50.
- Anguiano-Beltran C, Searcy-Bernal R, Garcia-Ortega AM, Garcia-Esquivel Z, Valenzuela-Espinoza E. 2012. Effect of three bacterial isolates from a commercial hatchery on early red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Aquaculture International* 20:993-1001.

- Anguiano-Beltran C, Searcy-Bernal R, Lizarraga-Partida ML. 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33:119-122.
- Araya MT, Markham F, Mateo DR, McKenna P, Johnson GR, Berthe FCJ, Siah A. 2010. Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*. *Fish & Shellfish Immunology* 29:557-564.
- Atsumi T, McCarter L, Imae Y. 1992. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature* 355:182-184.
- Austin B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* 140:310-317.
- Austin B, Austin D, Sutherland R, Thompson F, Swings J. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental Microbiology* 7:1488-1495.
- Austin B, Zhang XH. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43:119-124.
- Aviles F, Rozbaczylo N, Godoy M, Munoz G. 2007a. The first report of *Phoronis sp* (Phoronida) in red abalone (*Haliotis Rufescens*) in Chile. *Journal of Shellfish Research* 26:859-861.
- Aviles F, Rozbaczylo N, Herve M, Godoy M. 2007b. First report of polychaetes from the genus *Oriopsis* (polychaeta : sabellidae) associated with the Japanese abalone *Haliotis discus hannai* and other native molluscs in Chile. *Journal of Shellfish Research* 26:863-867.
- Azevedo C, Balseiro P, Casal G, Gestal C, Aranguren R, Stokes NA, Carnegie RB, Novoa B, Burreson EM, Figueras A. 2006a. Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 92:23-32.
- Azevedo C, Casal G, Montes J. 2008. Ultrastructural developmental cycle of *Haplosporidium montforti* (phylum Haplosporidia) in its farmed abalone host, *Haliotis tuberculata* (Gastropoda). *Journal of Parasitology* 94:137-142.
- Azevedo C, Conchas RF, Tajdari J, Montes J. 2006b. Ultrastructural description of new *Rickettsia*-like organisms in the commercial abalone *Haliotis tuberculata* (Gastropoda : Haliotidae) from the NW of Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:233-237.

B

- Bai FF, Sun BG, Woo NYS, Zhang XH. 2010. *Vibrio harveyi* hemolysin induces ultrastructural changes and apoptosis in flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395:70-75.
- Baker-Austin C, Gore A, Oliver JD, Rangdale R, McArthur JV & Lees DN (2010) Rapid in situ detection of virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oyster matrices using real-time PCR. *Environmental Microbiology Reports* 2: 76-80.
- Balseiro P, Aranguren R, Gestal C, Novoa B, Figueras A. 2006. *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture* 258:63-72.

- Basuyaux O. 1997. Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques sur la croissance de l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) en élevage en circuit semi-fermé. In: Université de Caen, France. p 237.
- Baud V, Karin M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends in Cell Biology 11:372-377.
- Baumann P, Baumann L, Bang S, Woolkalis M. 1980. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Beneckea*. Current Microbiology 4:127-132.
- Bayne CJ. 1990. Phagocytosis and non-self recognition in Invertebrates. Bioscience 40:723-731.
- Beachey EW. 1981. Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. Journal of Infectious Diseases 143:325-345.
- Beck G, Ellis TW, Habicht GS, Schluter SF, Marchalonis JJ. 2002. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. Developmental and Comparative Immunology 26:11-26.
- Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M. 1974. Enzymatic assay of acid phosphatase. In: Methods of enzymatic analysis: Academic Press New York and London.
- Beschin A, Bilej M, Torreele E, De Baetselier P. 2001. On the existence of cytokines in invertebrates. Cellular and Molecular Life Sciences 58:801-814.
- Bevelander G. 1988. Abalone: gross and fine structure: Boxwood Press.
- Bisha B, Simonson J, Janes M, Bauman K, Goodridge LD. 2012. A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. International Journal of Food Science and Technology 47:885-899.
- Blackstone GM, Nordstrom JL, Bowen MD, Meyer RF, Imbro P, DePaola A. 2007. Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay. Journal of Microbiological Methods 68:254-259.
- Blackstone GM, Nordstrom JL, Vickery MCL, Bowen MD, Meyer RF, DePaola A. 2003. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. Journal of Microbiological Methods 53:149-155.
- Blanco-Abad V, Ansedo-Bermejo J, Rodriguez-Castro A & Martinez-Urtaza J (2009) Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* 129: 229-236.
- Bleves S, Cornelis GR. 2000. How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. Microbes and Infection 2:1451-1460.
- Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP, Arthur JR, Ogawa K, Chinabut S, Adlard R, Tan Z, Shariff M. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. Veterinary Parasitology 132:249-272.
- Bower SM. 1987. Pathogenicity and host specificity of *Labyrinthuloides haliotidis* (Protozoa: Labyrinthomorpha), a parasite of juvenile abalone. Canadian Journal of Zoology 65:2008-2012.
- Bower SM. 2001. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Nematode Parasitism of Abalone. In: <http://www.pacdfom-pogcca/science/species-especies/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/nemparab-enghtm>.

- Bower SM. 2002. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Trematode Metacercariae of Abalone. In: <http://www.pacdfom.pogcca/science/species-especes/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/tremetab-enghtm>.
- Bower SM. 2003. Update on emerging abalone diseases and techniques for health assessment. *Journal of Shellfish Research* 22:805-810.
- Bower SM. 2006. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Kidney Coccidia of Abalone. In: <http://www.pacdfom.pogcca/science/species-especes/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/kidcocab-enghtm>.
- Bower SM. 2007. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Blister Disease of Cultured Abalone. In: <http://www.pacdfom.pogcca/science/species-especes/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/blistdab-enghtm>.
- Bower SM. 2010a. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Bacterial Diseases of Abalone. In: <http://www.pacdfom.pogcca/science/species-especes/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/vibrioab-enghtm>.
- Bower SM. 2010b. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Perkinsus olsenii* of Abalone. In: <http://www.pacdfom.pogcca/science/species-especes/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/perkolab-enghtm>.
- Bower SM, McLean N, Whitaker DJ. 1989. Mechanism of infection by *Labyrinthuloides haliotidis*, a parasite of abalone. *Journal of Invertebrate Pathology* 53:401-409.
- Braun M, Stuber K, Schlatter Y, Wahli T, Kuhnert P, Frey J. 2002. Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida*. *Journal of Bacteriology* 184:1851-1858.
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garriy G. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria*. In: New York: Springer.
- Brevik OJ, Ottem KF, Kamaishi T, Watanabe K, Nylund A. 2011. *Francisella halioticida* sp nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *Journal of Applied Microbiology* 111:1044-1056.
- Broberg CA, Calder TJ, Orth K. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection* 13:992-1001.
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3:238-250.
- Bryan PJ, Steffan RJ, DePaola A, Foster JW, Bej AK. 1999. Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Current Microbiology* 38:168-175.
- Budde PP, Davis BM, Yuan J, Waldor MK. 2007. Characterization of a higBA toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 189:491-500.
- Bukowski M, Rojowska A, Wladyka B. 2011. Prokaryotic toxin-antitoxin systems - the role in bacterial physiology and application in molecular biology. *Acta Biochimica Polonica* 58:1-9.
- Burr SE, Stuber K, Frey J. 2003. The ADP-ribosylating toxin, AexT, from *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. *Journal of Bacteriology* 185:6583-6591.

Bussell JA, Gidman EA, Causton DR, Gwynn-Jones D, Malham SK, Jones MLM. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2008. 358:78-85.

C

- Cabello AE, Espejo RT & Romero J (2005) Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 327: 157-166.
- Caceres-Martinez J, Tinoco-Orta GD. 2001. Symbionts of cultured red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research* 20:875-881.
- Cai J, Han Y, Wang Z. 2006a. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities. *Aquaculture* 257:161-166.
- Cai JP, Han HC, Song ZP, Li CX, Zhou J. 2006b. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased postlarval abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (Lischke). *Aquaculture Research* 37:1222-1226.
- Cai JP, Li J, Thompson KD, Li CX, Han HC. 2007. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Basic Microbiology* 47:84-86.
- Cai JP, Lin SY, Wu B. 2009. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* associated with diseased postlarval abalone in Shenzhen, China. *Aquaculture International* 17:449-458.
- Cai JP, Wang ZX, Cai CH, Zhou YP. 2008. Characterization and identification of virulent *Klebsiella oxytoca* isolated from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) postlarvae with mass mortality in Fujian, China. *Journal of Invertebrate Pathology* 97:70-75.
- Cajaraville MP, Olabarrieta I, Marigomez I. 1996. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: A case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35:253-260.
- Campbell MS, Wright AC. 2003. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7137-7144.
- Campbell N, Reece J. 2007. Biologie. Paris, France: Pearson Education, Inc.
- Canesi L, Barmo C, Fabbri R, Ciacci C, Vergani L, Roch P, Gallo G. 2010. Effects of vibrio challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 152:399-406.
- Cano-Gomez A, Bourne DG, Hall MR, Owens L, Hoj L. 2009. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. *Aquaculture* 287:1-10.
- Cano-Gomez A, Goulden EF, Owens L, Hoj L. 2010. *Vibrio owensii* sp nov., isolated from cultured crustaceans in Australia. *FEMS Microbiology Letters* 302:175-181.
- Cardinaud M, Barbou A, Alain C, Capitaine C, Bidault-Toffin A, Dujon A, Paillard C. submitted-a. Portal of entry and infection dynamic during the earlier stages of vibriosis in European abalone *Haliotis tuberculata*. *FEMS pathogens*.

- Cardinaud M, Offret C, Huchette S, Moraga D, Paillard C. submitted-b. The impacts of handling and air exposure on immune parameters, gene expression, and susceptibility to vibriosis of European abalone *Haliotis tuberculata*. Fish and Shellfish Immunology.
- 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. The damage-response framework of microbial pathogenesis. Nature Reviews Microbiology 1:17-24.
- Casadevall A, Pirofski LA. 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. Journal of Water and Health 7:S2-S18.
- Cerenius L, Kawabata SI, Lee BL, Nonaka M, Soderhall K. 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. Trends in Biochemical Sciences 35:575-583.
- Chaikeeratisak V, Somboonwiwat K, Wang HC, Lo CF, Tassanakajon A. 2012. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in the lymphoid organ of *Vibrio harveyi*-infected *Penaeus monodon*. Molecular Biology Reports 39:6367-6377.
- Chang PH, Kuo ST, Lai SH, Yang HS, Ting YY, Hsu CL, Chen HC. 2005a. Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. Diseases of Aquatic Organisms 65:23-27.
- Chang PH, Yang MC, Kuo ST, Chen MH, Cheng CH. 2008. Occurrence of a rickettsia-like prokaryote in the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, cultured in Taiwan. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 28:52-57.
- Chang W, Small DA, Toghrol F, Bentley WE. 2005b. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. BMC Genomics 6:1-14.
- Chen BS, Xu LW, Guo ZX, Yang HZ. 2004. New species of *Cryptobia* sp N. (Kinetoplastida, Bodinina, Bodonidae) found in the blood of the farmed abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve. Journal of Shellfish Research 23:1169-1171.
- Chen CY, Wu KM, Chang YC, Chang CH, Tsai HC, Liao TL, Liu YM, Chen HJ, Shen ABT, Li JC, Su TL, Shao CP, Lee CT, Hor LI, Tsai SF. 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. Genome Research 13:2577-2587.
- Chen FR, Liu PC, Lee KK. 1999. Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. Microbios 98:95-111.
- Chen MY, Yang HS, Delaporte M, Zhao SJ, Xing K. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2007. 345:52-60.
- Cheng L, Huang J, Shi CY, Thompson KD, Mackey B, Cai JP. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Mass Mortality of Postlarval Abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (L.), in Sanya, China. Journal of the World Aquaculture Society 39:746-757.
- Cheng W, Hsiao IS, Chen JC. 2004a. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish & Shellfish Immunology 17:193-202.
- Cheng W, Hsiao IS, Hsu CH, Chen JC. 2004b. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish & Shellfish Immunology 17:235-243.
- Cheng W, Li CH, Chen JC. 2004c. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture 232:103-115.

- Cheng WT, Hsiao IS, Chen JC. 2004d. Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 60:157-164.
- Cheng WT, Juang FM, Chen JC. 2004e. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology* 16:295-306.
- Chi SL, Pizzo SV. 2006. Cell surface F₁F_o ATP synthase: A new paradigm? *Annals of Medicine* 38:429-438.
- Chimetto LA, Cleenwerck I, Alves N, Silva BS, Brocchi M, Willems A, De Vos P, Thompson FL. 2011. *Vibrio communis* sp. nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:362-368.
- Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas JL, Paillard C. 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 57:109-116.
- Clavier J. 1992. Infestation of *Haliotis tuberculata* shells by *Cliona celata* and *Polydora* species. In: Shepherd SA, Tegner MJ, Guzman del Proo SA, editors. *Abalone of the world : biology, fisheries and culture*. International Symposium on Abalone, 1., La Paz, Bolivie: Adelaide : Department of Fisheries. p 16-20.
- Clavier J, Chardy P. 1989. Investigation into the ecology of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.), factors influencing spatial distribution. *Aquatic living resources* 2:191-197.
- Cochard JC. 1980. Recherches sur les facteurs déterminant la sexualité et la reproduction chez *Haliotis tuberculata* L. In: Université de Bretagne Occidentale.
- Combes C. 2005. *The art of being a parasite*: University of Chicago Press.
- Combes C. 2010. *Les associations du vivant: l'art d'être parasite*: Flammarion.
- Conejero MJU, Hedreyda CT. 2003. Isolation of partial toxR gene of *Vibrio harveyi* and design of toxR-targeted PCR primers for species detection. *Journal of Applied Microbiology* 95:602-611.
- Conejero MJU, Hedreyda CT. 2004. PCR detection of hemolysin (vhh) gene in *Vibrio harveyi*. *Journal of General and Applied Microbiology* 50:137-142.
- Cornelis G, Sory MP, Laroche Y, Derclaye I. 1986. Genetic analysis of the plasmid region controlling virulence in *Yersinia enterocolitica* O:9 by Mini-Mu insertions and *lac* gene fusions. *Microbial pathogenesis* 1:349-359.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1315-+.
- Courtois de Vicose G, Viera MP, Bilbao A, Izquierdo MS. 2007. Embryonic and larval development of *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve: An indexed micro-photographic sequence. *Journal of Shellfish Research* 26:847-854.
- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. 2010. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal* 425:313-325.
- Craig L, Pique ME, Tainer JA. 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 2:363-378.
- Crofts DR. 1929. *Haliotis*: The University Press of Liverpool.
- Crofts DR. 1937. The development of *Haliotis tuberculata*, with special reference to organogenesis during torsion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 228:219-268.

Culley MB, Peck LS. 1981. The feeding preferences of the ormer, *Haliotis tuberculata*, L. Kieler Meeresforschungen Sonderheft 5:570-572.

D

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 287:443-449.

Davis G, Park R. 1962. A taxonomic study of certain bacteria currently classified as *Vibrio* species. *Journal of General Microbiology* 27:101-119.

De Decker S. 2010. Approches multifactorielles pour l'étude d'interactions entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et deux *Vibrio* pathogènes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* : épidémiologie, variabilité de la sensibilité de l'hôte et pathogénèse. In: Université de La Rochelle, France.

De Decker S, Saulnier D. 2011. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish & Shellfish Immunology* 30:691-699.

de Lamarck JBM. 1822. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres: Verdière.

De Maio A. 1999. Heat shock proteins: Facts, thoughts, and dreams. *Shock* 11:1-12.

De Meeûs T, Renaud F. 2002. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends in Parasitology* 18:247-251.

De Zoysa M, Jung S, Lee J. 2009a. First molluscan TNF-alpha homologue of the TNF superfamily in disk abalone: Molecular characterization and expression analysis. *Fish & Shellfish Immunology* 26:625-631.

De Zoysa M, Nikapitiya C, Lee Y, Lee S, Oh C, Whang I, Yeo SY, Choi CY, Lee J. 2010a. First molluscan transcription factor activator protein-1 (Ap-1) member from disk abalone and its expression profiling against immune challenge and tissue injury. *Fish & Shellfish Immunology* 29:1028-1036.

De Zoysa M, Nikapitiya C, Moon DO, Whang I, Kim GY, Lee J. 2009b. A novel Fas ligand in mollusk abalone: Molecular characterization, immune responses and biological activity of the recombinant protein. *Fish & Shellfish Immunology* 27:423-432.

De Zoysa M, Nikapitiya C, Oh C, Lee Y, Whang I, Lee JS, Choi CY, Lee J. 2011. Microarray analysis of gene expression in disk abalone *Haliotis discus discus* after bacterial challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 30:661-673.

De Zoysa M, Nikapitiya C, Oh C, Whang I, Lee JS, Jung SJ, Choi CY, Lee J. 2010b. Molecular evidence for the existence of lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF) and Rel/NF-kB pathways in disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish & Shellfish Immunology* 28:754-763.

De Zoysa M, Nikapitiya C, Whang I, Lee JS, Lee J. 2009c. Abhisin: A potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish & Shellfish Immunology* 27:639-646.

De Zoysa M, Pushpamali WA, Oh C, Whang I, Kim SJ, Lee J. 2008. Transcriptional up-regulation of disk abalone selenium dependent glutathione peroxidase by H₂O₂ oxidative stress and *Vibrio alginolyticus* bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25:446-457.

- De Zoysa M, Whang I, Lee Y, Lee S, Lee JS, Lee J. 2010c. Defensin from disk abalone *Haliotis discus discus*: Molecular cloning, sequence characterization and immune response against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology* 28:261-266.
- De Bary A. 1879. Die erscheinung der symbiose. Karl J Trubner, Strassburg:1-30.
- Defer D, Bourgougnon N, Fleury Y. 2009. Detection and partial characterisation of an antimicrobial peptide (littorein) from the marine gastropod *Littorina littorea*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34:188-190.
- Defoirdt T, Benneche T, Brackman G, Coenye T, Sorgeloos P, Scheie AA. 2012. A Quorum Sensing-Disrupting Brominated Thiophenone with a Promising Therapeutic Potential to Treat Luminescent Vibriosis. *Plos One* 7.
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 25:472-479.
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. 2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *Isme Journal* 2:19-26.
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. 2009. Short-chain fatty acids and poly-beta-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances* 27:680-685.
- Defoirdt T, Crab R, Wood TK, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. 2006a. Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6419-6423.
- Defoirdt T, Halet D, Sorgeloos P, Bossier P, Verstraete W. 2006b. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture* 261:804-808.
- Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology* 14:251-258.
- Delapena LD, Nakai T & Muroga K (1995) Dynamics of *Vibrio* sp. in organs of orally infected Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology* 30: 39-45.
- Deter J, Lozach S, Veron A, Chollet J, Derrien A, Hervio-Heath D. 2010. Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. *Environmental Microbiology* 12:929-937.
- Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449:811-818.
- Devenish RJ, Prescott M, Rodgers AJW. 2008. The structure and function of mitochondrial F(1)F(0)-ATP synthases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 267 267:1-+.
- Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:6025-6030.
- Diaz-Orejas R, Diago-Navarro E, Arriaga AMH, Lopez-Villarejo J, Lemonnier M, Moreno-Cordoba I, Nieto C, Espinosa M. 2010. Bacterial toxin-antitoxin systems targeting translation. *Journal of Applied Biomedicine* 8:179-188.
- Diggles BK, Nichol J, Hine PM, Wakefield S, Cochennec-Laureau N, Roberts RD, Friedman CS. 2002. Pathology of cultured paua *Haliotis iris* infected with a novel haplosporidian

- parasite, with some observations on the course of disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 50:219-231.
- Diggles BK, Oliver M. 2005. Diseases of cultured paua (*Haliotis iris*) in New Zealand. In: Walker PJ, Lester RG, Bondad-Reantaso MG, editors. *Diseases in Asian Aquaculture*. p 275-287.
- Dixon MG, Hecht T, Brandt CR. 1991. Identification and treatment of a *Clostridium* and *Vibrio* infection in South-African abalone, *Haliotis midae*. *Journal of Fish Diseases* 14:693-695.
- Doherty CP. 2007. Host-pathogen interactions: The role of iron. *Journal of Nutrition* 137:1341-1344.
- Dolashka P, Moshtanska V, Borisova V, Dolashki A, Stevanovic S, Dimanov T, Voelter W. 2011. Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. *Peptides* 32:1477-1483.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15:167-+.
- Dorsch M, Lane D, Stackebrandt E. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* bases on 16S ribosomal-RNA sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42:58-63.

E-F

- Ekanayake PM, De Zoysa M, Kang HS, Wan Q, Jee Y, Lee YH, Kim SJ, Lee J. 2008. Cloning, characterization and tissue expression of disk abalone (*Haliotis discus discus*) catalase. *Fish & Shellfish Immunology* 24:267-278.
- Ekanayake PM, Kang HS, De Zoysa M, Jee Y, Lee YH, Lee J. 2006. Molecular cloning and characterization of Mn-superoxide dismutase from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 145:318-324.
- Elston R, Wood GSL. 1983. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Fish Diseases* 6:111-128.
- Emch M, Feldacker C, Islam MS, Ali M. 2008. Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns. *International Journal of Health Geographics* 7:13.
- Esnault S, Barraer F. 2005. Etude chronologique des températures de la mer sur l'ouest de la France. In: Rapport de l'IUT de l'Université de Bretagne Sud.
- Evans AS. 1976. Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *The Yale journal of biology and medicine* 49:175.
- Falkow S. 1988. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Reviews of Infectious Diseases*:274-276.
- Falkow S. 2004. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity - a personal recollection 15 years later. *Nature Reviews Microbiology* 2:67-72.
- Fallu R. 1991. *Abalone Farming*: John Wiley & Sons.
- FAO/WHO. 2001. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria* In. Cordoba, Argentine.
- Farcy E, Serpentine A, Fievet B, Lebel JM. 2007. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to

- thermal stress in hemocyte primary culture. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 146:540-550.
- Faruque SM, Biswas K, Udden SMN, Ahmad QS, Sack DA, Nair GB, Mekalanos JJ. 2006. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6350-6355.
- Feig C, Peter ME. How apoptosis got the immune system in shape. *European Journal of Immunology*. 2007. 37:S61-S70.
- Fenton HJH, Jackson HJ. 1899. I.—The oxidation of polyhydric alcohols in presence of iron. *J Chem Soc, Trans* 75:1-11.
- Fisher RA. 1930. *The Theory of Natural Selection*: Oxford University Press, London.
- Ford SE, Paillard C. 2007. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 23:280-291.
- Forster GR. 1962. Observations on the ormer population of Guernsey. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 42:493-498.
- Fretter V, Pilkington MC. 1971. The larval shell of some prosobranch gastropods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51:49-62.
- Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical (O⁻² radical anion), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry* 272:18515-18517.
- Friedman CS, Andree KB, Beauchamp KA, Moore JD, Robbins TT, Shields JD, Hedrick RP. 2000. '*Candidatus Xenohalictis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis spp.*, along the west coast of North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:847-855.
- Friedman CS, Gardner GR, Hedrick RP, Stephenson M, Cawthorn RJ, Upton SJ. 1995. *Pseudoklossia haliotis* sp. nov. (Apicomplexa) from the kindey of california abalone *Haliotis spp.* (Mollusca). *Journal of Invertebrate Pathology* 66:33-38.
- Friedman CS, Roberts W, Kismohandaka G, Hedrick RP. 1993. Transmissibility of a coccidian parasite of abalone, *Haliotis spp.* *Journal of Shellfish Research* 12:201-205.
- Friedman CS, Thomson M, Chun C, Haaker PL, Hedrick RP. 1997. Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *Journal of Shellfish Research* 16:403-411.
- Fu YW, Hou WY, Yeh ST, Li CH, Chen JC. 2007. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 22:673-685.
- Fukui Y, Sawabe T. 2008. Rapid detection of *Vibrio harveyi* in seawater by real-time PCR. *Microbes and Environments* 23:172-176.
- Fullner KJ, Mekalanos JJ. 2000. In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *Embo Journal* 19:5315-5323.

G

- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel JY, Saulnier D, Renault T. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology*. 2007. 84:92-102.

- Gaillard JM. 1958. *Haliotis tuberculata* Linne. Systematique et distribution. Bulletin, Laboratoire Maritime, Dinard 44:7-11.
- Gardner GR, Harshbarger JC, Lake JL, Sawyer TK, Price KL, Stephenson MD, Haaker PL, Togstad HA. 1995. Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. Journal of Invertebrate Pathology 66:111-120.
- Gauger EJ, Gomez-Chiarri M. 2002. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V-carchariae*. Diseases of Aquatic Organisms 52:39-46.
- Geiger DL. 1998. Recent genera and species of the family Haliotidae Rafinesque, 1815 (Gastropoda : Vetigastropoda). Nautilus 111:85-116.
- Geiger DL, Groves LT. 1999. Review of fossil abalone (Gastropoda : Vetigastropoda : Haliotidae) with comparison to Recent species. Journal of Paleontology 73:872-885.
- Ghittino C, Latini M, Agnetti F, Panziera C, Lauro L, Ciappelloni R, Petracca G. 2003. Emerging pathologies in aquaculture: Effects on production and food safety. Veterinary Research Communications 27:471-479.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition 125:1401-1412.
- Girard A. 1972. La reproduction de l'Ormeau *Haliotis tuberculata* L. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 36:163-184.
- Goetz FW, Planas JV, MacKenzie S. 2004. Tumor necrosis factors. Developmental and Comparative Immunology 28:487-497.
- Goggin CL, Lester RJG. 1995. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia - a review. Marine and Freshwater Research 46:639-646.
- Gomez-Gil B, Fajer-Avila E, Garcia-Vargas F. 2007. Vibrios of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico. Journal of Applied Microbiology 102:1518-1526.
- Gomez-Gil B, Soto-Rodriguez S, Garcia-Gasca A, Roque A, Vazquez-Juarez R, Thompson FL, Swings J. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. Microbiology-Sgm 150:1769-1777.
- Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC, Swings J. 2003. *Vibrio rotiferianus* sp nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:239-243.
- Gonzalez RC, Brokordt K, Lohrmann KB. 2012. Physiological performance of juvenile *Haliotis rufescens* and *Haliotis discus hannai* abalone exposed to the withering syndrome agent. Journal of Invertebrate Pathology 111:20-26.
- Gonzalez-Escalona N, Strain EA, De Jesus AJ, Jones JL, DePaola A. 2011. Genome Sequence of the Clinical O4:K12 Serotype *Vibrio parahaemolyticus* Strain 10329. Journal of Bacteriology 193:3405-3406.
- Gordon KV, Vickery MC, DePaola A, Staley C & Harwood VJ (2008) Real-time PCR assays for quantification and differentiation of *Vibrio vulnificus* strains in oysters and water. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1704-1709.
- Gorski J. 2006. The effects of trace metals on the Australian abalone, *Haliotis rubra*. In: RMIT University, Melbourne, Australia.
- Gotoh K, Kodama T, Hiyoshi H, Izutsu K, Park KS, Dryselius R, Akeda Y, Honda T, Iida T. 2010. Bile Acid-Induced Virulence Gene Expression of *Vibrio parahaemolyticus* Reveals a Novel Therapeutic Potential for Bile Acid Sequestrants. Plos One 5:12.

- Gourdon I, Guérin MC, Torreilles J. 1998. Cellular and molecular mechanisms of the stress response in marine bivalves]. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 192:749.
- Granath WO, Yoshino TP. 1984. Intracellular distribution of lysosomal enzymes within hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. *Transactions of the American Microscopical Society* 103:38-43.
- Grindley RM, Keogh JA, Friedman CS. 1998. Shell lesions in New Zealand *Haliotis* spp. (Mollusca, Gastropoda). *Journal of Shellfish Research* 17:805-811.
- Guillou F, Mitta G, Galinier R, Coustau C. 2007. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and Comparative Immunology* 31:657-671.
- Gyles CL. 2011. Relevance in pathogenesis research. *Veterinary Microbiology* 153:2-12.

H

- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249:7130-7139.
- Hahn KO. 1989. Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. Handbook of culture of abalone and other marine gastropods.
- Haine ER. 2008. Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275:353-361.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. 1999. 41:95-8.
- Hamilton WD. 1964. The genetical evolution of social behaviour. I. *Journal of theoretical biology* 7:1-16.
- Harris L, Owens L, Smith S. 1996. A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3548-3550.
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD. 2002. Ecology - Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296:2158-2162.
- Hayashi I. 1980. The reproductive biology of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *J Mar Biol Assoc UK* 60:415-430.
- Hayashi I. Seasonal changes in condition factors and in the C-N ratio of the foot of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1983. 63:85-95.
- Hayes F. 2003. Toxins-antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301:1496-1499.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione transferases. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Palo Alto: Annual Reviews. p 51-88.
- He XC, Zhang Y, Yu ZN. An Mpeg (macrophage expressed gene) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Molecular characterization and gene expression. *Fish & Shellfish Immunology*. 2011. 30:870-6.
- Hegaret H, Wikfors GH, Soudant P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2003. 293:249-65.

- Hendrie MS, Hodgkiss W, Shewan JM. 1970. The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria. *Journal of General Microbiology* 64:151-169.
- Henke JM, Bassler BL. 2004. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 186:3794-3805.
- Hine PM, Wakefield S, Diggles BK, Webb VL, Maas EW. 2002. Ultrastructure of a haplosporidian containing *Rickettsiae*, associated with mortalities among cultured paua *Haliotis iris*. *Diseases of Aquatic Organisms* 49:207-219.
- Hisbi D, Vandenberghe J, Robles R, Verdonck L, Swings J, Sorgeloos P. 2000. Characterisation of *Vibrio* and related bacteria associated with shrimp *Penaeus monodon* larvae in Indonesia. VLIZ Collected Reprints: Marine and Coastal Research in Flanders 30.
- Hoffmann A, Baltimore D. 2006. Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunological reviews* 210:171-186.
- Hoffmann M, Monday SR, Allard MW, Strain EA, Whittaker P, Naum M, McCarthy PJ, Lopez JV, Fischer M, Brown EW. 2012. *Vibrio caribbeanicus* sp nov., isolated from the marine sponge *Scleritoderma cyanea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:1736-1743.
- Holmstrom K, Graslund S, Wahlstrom A, Pongshompoo S, Bengtsson BE, Kautsky N. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology* 38:255-266.
- Homma M, Oota H, Kojima S, Kawagishi I, Imae Y. 1996. Chemotactic responses to an attractant and a repellent by the polar and lateral flagellar systems of *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology-Uk* 142:2777-2783.
- Honda T, Arita M, Ayala E, Miwatani T. 1988. Production of pili on *Vibrio parahaemolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology* 34:1279-1281.
- Hong XG, Sun XQ, Zheng MG, Qu LY, Zan JD, Zhang JX. 2008. Characterization of defensin gene from abalone *Haliotis discus hannai* and its deduced protein. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 26:375-379.
- Hooper C, Day R, Slocombe R, Benkendorff K, Handlinger J. 2011. Effect of movement stress on immune function in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aquaculture* 315:348-354.
- Hooper C, Day R, Slocombe R, Handlinger J, Benkendorff K. 2007a. Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology* 22:363-379.
- Hooper C, Hardy-Smith P, Handlinger J. 2007b. Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Australian Veterinary Journal* 85:188-193.
- Hou WY, Chen JC. 2005. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 19:127-138.
- Hsieh YC, Liang SM, Tsai WL, Chen YH, Liu TY, Liang CM. 2003. Study of capsular polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity* 71:3329-3336.
- Huang CY, Liu PC, Lee KK. 2001. Withering syndrome of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and associated with thermal induction. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 56:898-901.
- Huang XD, Liu WG, Guan YY, Shi Y, Wang Q, Zhao M, Wu SZ, He MX. 2012. Molecular cloning and characterization of class I NF- κ B transcription factor from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Fish & Shellfish Immunology* 33:659-666.

- Huchette S, Paillard C, Clavier J, Day R. 2006. Shell disease: abnormal conchiolin deposit in the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68:267-271.
- Huchette SMH, Clavier J. 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *Journal of Shellfish Research* 23:951-955.
- Huchette SMH, Koh CS, Day RW. 2003. The effects of density on the behaviour and growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*). *Aquaculture International* 11:411-428.
- Humphries JE, Yoshino TP. 2008. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and Comparative Immunology* 32:554-562.
- Huq A, Small EB, West PA, Huq MI, Rahman R, Colwell RR. 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 45:275-283.
- Huynh TG, Yeh ST, Lin YC, Shyu JF, Chen LL, Chen JC. 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 31:286-293.

I-J-K

- Iakovleva NV, Gorbushin AM, Storey KB. 2006. Modulation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) activity in response to different immune stimuli in haemocytes of the common periwinkle *Littorina littorea*. *Fish & Shellfish Immunology* 21:315-324.
- Iehata S, Inagaki T, Okunishi S, Nakano M, Tanaka R, Maeda H. 2009. Colonization and probiotic effects of lactic acid bacteria in the gut of the abalone *Haliotis gigantea*. *Fisheries Science* 75:1285-1293.
- Iguchi SMM, Aikawa T, Matsumoto JJ. 1982. Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 72:571-574.
- Iriarte M, Cornelis GR. 1998. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Molecular Microbiology* 29:915-929.
- Ishii T, Warabi E, Yanagawa T. 2012. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 50:91-105.
- Jardillier E, Rousseau M, Gendron-Badou A, Frohlich F, Smith DC, Martin M, Helleouet MN, Huchette S, Doumenc D, Auzoux-Bordenave S. 2008. A morphological and structural study of the larval shell from the abalone *Haliotis tuberculata*. *Marine Biology* 154:735-744.
- Jiang YS, Wu XZ. 2007. Characterization of a Rel/NF-kappa B homologue in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *Developmental and Comparative Immunology* 31:121-131.
- Jiravanichpaisal P, Miyazakia T, Limsuwanb C. 1994. Histopathology, Biochemistry, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Infecting Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health* 6:27-35.
- Johnson FH, Shunk IV. 1936. An interesting new species of luminous bacteria. *Journal of bacteriology* 31:585.

- Johnston D, Moltschaniwskyj N, Wells J. 2005. Development of the radula and digestive system of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) Potential factors responsible for variable weaning success on artificial diets. *Aquaculture* 250:341-355.
- Kaneko T, Colwell RR. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. *Journal of bacteriology* 113:24-32.
- Kanjana K, Radtanatip T, Asuvapongpatana S, Withyachumnarnkul B, Wongprasert K. 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 30:389-396.
- Kaplan EL, Meier P. 1958. Nonparametric-estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 53:457-481.
- Karinch AM, Pan M, Lin CM, Strange R, Souba WW. 2001. Glutamine metabolism in sepsis and infection. *Journal of Nutrition* 131:2535S-2538S.
- Karlsen C, Paulsen SM, Tunsjo HS, Krinner S, Sorum H, Haugen P, Willassen NP. 2008. Motility and flagellin gene expression in the fish pathogen *Vibrio salmonicida*: Effects of salinity and temperature. *Microbial Pathogenesis* 45:258-264.
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR, Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128:203-209.
- Kawagishi I, Maekawa Y, Atsumi T, Homma M, Imae Y. 1995. Isolation of the polar and lateral flagellum defective mutants in *Vibrio aginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources. *Journal of Bacteriology* 177:5158-5160.
- Kawamura T, Roberts RD, Takami H. 1998. A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *Journal of Shellfish Research* 17:615-625.
- Kawamura T, Takami H, Roberts RD, Yamashita Y. 2001. Radula development in abalone *Haliotis discus hannai* from larva to adult in relation to feeding transitions. *Fisheries Science* 67:596-605.
- Kemp IK, Coyne VE. Identification and characterisation of the Mpeg1 homologue in the South African abalone, *Haliotis midae*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2011. 31:754-64.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274:1-14.
- Keyhani NO, Roseman S. 1999. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1473:108-122.
- Kim KY, Lee SY, Cho YS, Bang IC, Kim KH, Kim DS, Nam YK. 2007. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23:1043-1059.
- Kimes NE, Grim CJ, Johnson WR, Hasan NA, Tall BD, Kothary MH, Kiss H, Munk AC, Tapia R, Green L, Detter C, Bruce DC, Brettin TS, Colwell RR, Morris PJ. 2012. Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Isme Journal* 6:835-846.
- Kingdon HS, Hubbard JS, Stadtman ERB. 1968. Glutamine synthase activity assay. *Biochemistry* 7:2136-2142.
- Kitiyodom S, Khemtong S, Wongtavatchai J, Chuanchuen R. 2010. Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio spp.* isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*). *Fems Microbiology Ecology* 72:219-227.
- Kline KA, Falker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. 2009. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe* 5:580-592.

- Koike Y. 1978. Biological and ecological studies on the propagation of the ormer, *Haliotis tuberculata*, Linnaeus. I. Larval development and growth of juveniles. *La Mer* 16:124-136.
- Koike Y, Flassch J, Mazurier J. 1979. Biological and ecological studies on the propagation of the ormer, *Haliotis tuberculata*, Linnaeus. II. Influence of food and density on the growth of juveniles. *La Mer* 17:43-52.
- Krachler AM, Ham H, Orth K. 2011. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:11614-11619.
- Kubota Y, Watanabe Y, Otsuka H, Tamiya T, Tsuchiya T, Matsumoto JJ. 1985. Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 82:345-348.
- Kuhlmann W. 1989. Studies into detection *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*, using modified culturing media. *Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin* 43:843-847.
- Kumazawa NH, Tanigawa T, Kasagi N, Tanaka Y. 1991. Characterization of hemocytes of an estuarine gastropod mollusk, *Clithon retropictus*, bases on lysosomal enzymes. *CJournal of Veterinary Medical Science* 53:725-726.
- Kuris AM. 1996. Management and Risk Assessment of Sabellid Polychaete Infestations in Abalone Mariculture Facilities. In.
- Kustusch RJ, Kuehl CJ, Crosa JH. 2011. Power plays: iron transport and energy transduction in pathogenic vibrios. *Biometals* 24:559-566.

L

- 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* 8:2715-2724.
- Lachenbruch PA, Goldstein M. Discriminant Analysis. *Biometrics*. 1979 35:69-85.
- Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cueff A, Poulet SA. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. 67:2304-9.
- Lacoste A, Malham SK, Gelebart F, Cueff A, Poulet SA. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*. 2002. 26:1-9.
- Lamarcq LH & McFall-Ngai MJ (1998) Induction of a gradual, reversible morphogenesis of its host's epithelial brush border by *Vibrio fischeri*. *Infection and Immunity* 66: 777-785.
- Lambert C, Nicolas JL. 1998. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic Vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:53-63.
- Lambert C, Soudant P, Choquet G, Paillard C. 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology* 15:225-240.

- Lane E, Birkbeck TH. 1999. Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic Living Resources* 12:343-350.
- Larade K, Storey K. 2002. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates In: Elsevier, editor. *Sensing, Signaling and Cell Adaptation*. p 27–46.
- Larade K, Storey KB. 2007. Arrest of transcription following anoxic exposure in a marine mollusc. *Molecular and Cellular Biochemistry* 303:243-249.
- Laurencin FB & Germon E (1987) Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, by dipping in suspensions of *Vibrio anguillarum* - ways of bacterial penetration - ways influence of temperature and salinity. *Aquaculture* 67: 203-205.
- Lavillapitogo CR, Baticados MCL, Cruzlacierda ER, Delapena LD. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91:1-13.
- Le Moullac G, Soyeux C, Saulnier D, Ansquer D, Avarre JC, Levy P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunology*. 1998. 8:621-9.
- Lee KK, Liu PC, Chen YC, Huang CY. 2001. The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *Journal of Thermal Biology* 26:585-587.
- Lee KK, Liu PC, Huang CY. 2003. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes and Infection* 5:481-485.
- Lee KK, Yu SR, Yang TL, Liu PC, Chen FR. 1996. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Letters in Applied Microbiology* 22:111-114.
- Lester RJG, Davis GHG. 1981. A new perkinsus species from the abalone *Haliotis ruber*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37:181-187.
- Levin RE. 2006. *Vibrio parahaemolyticus*, a notably lethal human pathogen derived from seafood: A review of its pathogenicity, characteristics, subspecies characterization, and molecular methods of detection. *Food Biotechnology* 20:93-128.
- Li CC, Yeh ST, Chen JC. 2010a. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology* 28:121-127.
- Li HF, Sun XF, Cai ZH, Cai GP, Xing KZ. 2010b. Identification and analysis of a Cu/Zn superoxide dismutase from *Haliotis diversicolor supertexta* with abalone juvenile detached syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology* 103:116-123.
- Li TW, Ding MJ, Zhang J, Xiang JH, Liu RY. 1998a. Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal of Shellfish Research* 17:707-711.
- Li X, Wang B, Liu S, Liu M, Wang Q. 1998b. Studies on pathogen and histopathology of “crack shell disease” of *Haliotis discus hannai*. *Journal of Fisheries of China* 22:61-66.
- Lin BC, Wang Z, Malanoski AP, O'Grady EA, Wimpee CF, Vuddhakul V, Alves N, Thompson FL, Gomez-Gil B, Vora GJ. 2010. Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology Reports* 2:81-89.
- Ling H, Saeidi N, Rasouliha BH, Chang MW. 2010. A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates through membrane damage. *FEBS Letters* 584:3354-3358.
- Linhartova I, Bumba L, Masin J, Basler M, Osicka R, Kamanova J, Prochazkova K, Adkins I, Hejnova-Holubova J, Sadilkova L, Morova J, Sebo P. 2010. RTX proteins: a highly

- diverse family secreted by a common mechanism. *Fems Microbiology Reviews* 34:1076-1112.
- Liu CH, Cheng W, Hsu JP, Chen JC. 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms* 61:169-174.
- Liu M, Zhang YL, Inouye M, Woychik NA. 2008. Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:5885-5890.
- Liu PC, Chen YC, Huang CY, Lee KK. 2000. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Letters in Applied Microbiology* 31:433-437.
- Liu PC, Chen YC, Lee KK. 2001. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104:71-77.
- Liu PC, Lee KK, Yii KC, Kou GH, Chen SN. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 33:129-132.
- Liu Y, Yang G, Wang H, Chen J, Shi X, Zou G, Wei Q, Sun X. 2006. Design of *Vibrio* 16S rRNA gene specific primers and their application in the analysis of seawater *Vibrio* community. *Journal of Ocean University of China* 5:Journal of Ocean University of China, Volume 5, Issue 2, pp.157-164.
- Lo HR, Lin JH, Chen YH, Chen CL, Shao CP, Lai YC, Hor LI. 2011. RTX Toxin Enhances the Survival of *Vibrio vulnificus* During Infection by Protecting the Organism From Phagocytosis. *Journal of Infectious Diseases* 203:1866-1874.
- Lopez-Abarrategui C, Alba A, Silva ON, Reyes-Acosta O, Vasconcelos IM, Oliveira JTA, Migliolo L, Costa MP, Costa CR, Silva MRR, Garay HE, Dias SC, Franco OL, Otero-Gonzalez AJ. 2012. Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie* 94:968-974.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol chem* 193:265-275.
- Lucas T, O'Brien EK, Cribb T, Degnan BM. 2005. Digenean trematodes infecting the tropical abalone *Haliotis asinina* have species-specific cercarial emergence patterns that follow daily or semilunar spawning cycles. *Marine Biology* 148:285-292.
- Luo P, Hu CQ. 2008. *Vibrio alginolyticus* gyrB sequence analysis and gyrB-targeted PCR identification in environmental isolates. *Diseases of Aquatic Organisms* 82:209-216.
- Lux TM, Lee R, Love J. 2011. Complete Genome Sequence of a Free-Living *Vibrio furnissii* sp nov Strain (NCTC 11218). *Journal of Bacteriology* 193:1487-1488.
- Lynch M, Kuramitsu H. 2000. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 2:1245-1255.

M

- MacDonald JA, Storey KB. 2006. Identification of a 115kDa MAP-kinase activated by freezing and anoxic stresses in the marine periwinkle, *Littorina littorea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 450:208-214.
- Macey BM, Coyne VE. 2005. Improved growth rate and disease resistance in fanned *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 245:249-261.

- Mah SA, Moy GW, Swanson WJ, Vacquier VD. 2004. A perforin-like protein from a marine mollusk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316:468-475.
- Mah TFC, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9:34-39.
- Mahoney JC, Gerding MJ, Jones SH, Whistler CA. 2010. Comparison of the Pathogenic Potentials of Environmental and Clinical *Vibrio parahaemolyticus* Strains Indicates a Role for Temperature Regulation in Virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 76:7459-7465.
- Maiti B, Khushiramani R, Tyagi A, Karunasagar I. 2010. Recombinant ferritin protein protects *Penaeus monodon* infected by pathogenic *Vibrio harveyi*. *Diseases of aquatic organisms* 88:99.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361:743-749.
- Malagoli D, Casarini L, Sacchi S, Ottaviani E. 2007. Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology* 23:171-177.
- Malagoli D, Sacchi S, Ottaviani E. 2010. Lectins and cytokines in celomatic invertebrates: two tales with the same end. *Isj-Invertebrate Survival Journal* 7:1-10.
- Malham SK, Lacoste A, Gelebart F, Cueff A, Poulet SA. 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology* 295A:136-144.
- Malham SK, Lacoste A, Gelebart F, Cueff A, Poulet SA. 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology* 295A:136-144.
- Manganaro M, Laura R, Guerrero MC, Lanteri G, Zaccone D, Marino F. 2012. The morphology of gills of *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758). *Acta Zoologica* 93:436-443.
- Manti A, Falcioni T, Campana R, Sisti D, Rocchi M, Medina V, Dominici S, Papa S, Baffone W. 2010. Detection of environmental *Vibrio parahaemolyticus* using a polyclonal antibody by flow cytometry. *Environmental Microbiology Reports* 2:158-165.
- Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. . 1966. 50 (3):163-70.
- Marhual NP, Das BK. 2009. Use of Random Amplified Polymorphic DNA and Restriction Fragment Length Polymorphism for Typing of *Vibrio alginolyticus* Isolated from Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 3:75-82.
- Marhual NP, Das BK, Pradhan J, Swain P, Mishra BK, Eknath AE. 2012. RAPD-PCR and Outer Membrane Protein Characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Diseased shrimp. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 64:1-8.
- Matozzo V, Monari M, Foschi J, Papi T, Cattani O, Marin MG. Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina* L. Effects on immune responses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2005. 325:163-74.
- McAvaney LA, Day RW, Dixon CD, Huchette SM. 2004. Gonad development in seeded *Haliotis laevigata*: Growth environment determines initial reproductive investment. *Journal of Shellfish Research* 23:1213-1218.
- McBride SC, Rotem E, Ben-Ezra D, Shpigel M. 2001. Seasonal energetics of *Haliotis fulgens* (Philippi) and *Haliotis tuberculata* (L.). *Journal of Shellfish Research* 20:659-666.

- McCarter LL. 2001. Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:445-+.
- McCarter LL. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 7:18-29.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 244:6049-6055.
- McDiarmid H, Day R, Wilson R. 2004. The ecology of polychaetes that infest abalone shells in Victoria, Australia. *Journal of Shellfish Research* 23:1179-1188.
- Medzhitov R, Janeway CA. 1997. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bogwald J, Castex M, Ringo E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302:1-18.
- Mgaya YD. 1995. Synopsis of biological data on the European abalone (Ormer), *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758 (Gastropoda: Haliotidae): FAO.
- Mgaya YD, Mercer JP. 1995. The effects of size grading and stocking density on growth performance of juvenile abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. *Aquaculture* 136:297-312.
- Michel-Briand Y, Baysse C. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84:499-510.
- Millemann RE. 1951. *Echinocephalus pseudouncinatus* n. sp., a nematode parasite of the abalone. *The Journal of Parasitology*:435-439.
- Mims C, Nash A, Stephen J, Fitzgerald R. 2002. *Mims' Pathogenesis of Infectious Disease*: Academic Press.
- Mohandas A, Adema CM, Vanderknaap WPW, Sminia T. 1992. The effect of hemolymph extraction on distribution of lysosomal enzymes in *Lymnaea stagnalis* hemocytes - a cytochemical study. *Comparative Haematology International* 2:61-67.
- Montagnani C, Kappler C, Reichhart JM, Escoubas JM. 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappa B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Febs Letters* 561:75-82.
- Montgomery MT, Kirchman DL. 1993. Role of chitin binding proteins in the specific attachment of the marine *Vibrio harveyi* to chitin. *Applied and Environmental Microbiology* 59:373-379.
- Moore JD, Finley CA, Robbins TT, Friedman CS. 2002. Withering syndrome and restoration of southern California abalone populations. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 43:112-117.
- Moore JD, Juhasz CI, Robbins TT, Grosholz ED. 2007. The introduced sabellid polychaete *Terebrasabella heterouncinata* in California: Transmission, methods of control and survey for presence in native gastropod populations. *Journal of Shellfish Research* 26:869-876.
- Moore JD, Robbins TT, Friedman CS. 2000. Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal Rickettsiales-like prokaryote. *Journal of Aquatic Animal Health* 12:26-34.
- Moriarty DJW. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology* 237-243.
- Mottet MG. 1978. A review of the fishery biology of abalones: State of Washington, Department of Fisheries.

- Mouton A, Gummow B. 2011. The occurrence of gut associated parasites in the South African abalone, *Haliotis midae*, in Western Cape aquaculture facilities. *Aquaculture* 313:1-6.
- Munn CB, Marchant HK, Moody AJ. 2008. Defences against oxidative stress in vibrios associated with corals. *Fems Microbiology Letters* 281:58-63.

N-O

- Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, Kawano M, Harada N, Mawatari K, Nakaya Y. 2007a. Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species. *Letters in Applied Microbiology* 44:649-653.
- Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, Nakaya Y. 2007b. Modulation of pathogenicity with norepinephrine related to the type III secretion system of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Infectious Diseases* 195:1353-1360.
- Nakasone N, Iwanaga M. 1990. Pili of a *Vibrio parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor. *Infection and Immunity* 58:61-69.
- Nakasone N, Iwanaga M. 1991. Purification and characterization of pili isolated from *Vibrio parahaemolyticus*-Na2. *Infection and Immunity* 59:726-728.
- Nakatsugawa T, Nagai T, Hiya K, Nishizawa T, Muroga K. 1999. A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophia. *Diseases of Aquatic Organisms* 36:159-161.
- Natrah FMI, Ruwandeepika HAD, Pawar S, Karunasagar I, Sorgeloos P, Bossier P, Defoirdt T. 2011. Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Veterinary Microbiology* 154:124-129.
- Naylor JR, McShane PE. 1997. Predation by polychaete worms on larval and post-settlement abalone *Haliotis iris* (Mollusca:Gastropoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 214:283-290.
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of bacteriology* 104:313-322.
- Nhan DT, Cam DTV, Wille M, Defoirdt T, Bossier P, Sorgeloos P. 2010. Quorum quenching bacteria protect *Macrobrachium rosenbergii* larvae from *Vibrio harveyi* infection. *Journal of Applied Microbiology* 109:1007-1016.
- Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurie J, Thebault A. 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50:35-43.
- Nikapitiya C, De Zoysa M, Lee J. 2008. Molecular characterization and gene expression analysis of a pattern recognition protein from disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish & Shellfish Immunology* 25:638-647.
- Nikapitiya C, De Zoysa M, Oh C, Lee Y, Ekanayake PM, Whang I, Choi CY, Lee JS, Lee J. 2010. Disk abalone (*Haliotis discus discus*) expresses a novel antistatin-like serine protease inhibitor: Molecular cloning and immune response against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology* 28:661-671.
- Ninawe AS, Selvin J. 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. *Critical Reviews in Microbiology* 35:43-66.
- Nishimori E, Hasegawa O, Numata T, Wakabayashi H. 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathology* 33:495-502.

- Nottage AS, Birkbeck TH. 1987. Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* larvae with *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339 and the antigenic relationship between proteinases produced by marine vibrios pathogenic for fish and shellfish. *Journal of Fish Diseases* 10:265-273.
- Nottage AS, Birkbeck TH. 1990. Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 56:15-19.
- Oakes FR, Fields RC. 1996. Infestation of *Haliotis rufescens* shells by a sabellid polychaete. *Aquaculture* 140:139-143.
- Oberbeckmann S, Wichels A, Wiltshire KH, Gerdt G. 2011. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 100:291-307.
- Oliver LM, Fisher WS. 1999. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers* 4:510-530.
- Olsson JC, Joborn A, Westerdahl A, Blomberg L, Kjelleberg S & Conway PL (1996) Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? *Journal of Fish Diseases* 19: 225-234.
- Otsu R, Sasaki K. 1997. Virus-like particles detected from juvenile abalones (*Nordotis discus discus*) reared with an epizootic fatal wasting disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 70:167-168.
- Ottaviani E, Malagoli D, Franchini A. 2004. Invertebrate Humoral Factors: Cytokines as Mediators of Cell Survival. In: Beschin A, Müller WG, editors. *Invertebrate Cytokines and the Phylogeny of Immunity*: Springer Berlin Heidelberg. p 1-25.
- Owens L, Austin DA, Austin B. 1996. Effect of strain origin on siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:157-160.

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, Maes P. 1995. The brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 65:91-100.
- Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. 2003. Anti-TNF-alpha therapies: The next generation. *Nature Reviews Drug Discovery* 2:736-746.
- Pallen MJ, Matzke NJ. 2006. From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. *Nature Reviews Microbiology* 4:784-790.
- Pampanin DM, Ballarin L, Carotenuto L, Marin MG. Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*. 2002. 131:605-14.
- Panicker G & Bej AK (2005) Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: Comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vwA*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5702-5709.
- Paracer S, Ahmadjian V. 2000. *Symbiosis: an introduction to biological associations*: Oxford University Press, USA.

- Parham P. 2009. The immune system: Garland Science.
- Park JH, Cho YJ, Chun J, Seok YJ, Lee JK, Kim KS, Lee KH, Park SJ, Choi SH. 2011. Complete Genome Sequence of *Vibrio vulnificus* MO6-24/O. Journal of Bacteriology 193:2062-2063.
- Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Idia T, Honda T. 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. Infection and Immunity 72:6659-6665.
- Parry HE, Pipe RK. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). Aquatic Toxicology. 2004. 69:311-25.
- Pauly BS, Drubin DG. 2007. Clathrin: An amazing multifunctional dreamcoat? Cell Host & Microbe 2:288-290.
- Peck LS. 1989. Feeding, growth and temperature in the ormer, *Haliotis tuberculata* L. Progress in Underwater Science 14:95-107.
- Pedersen K, Verdonck L, Austin B, Austin DA, Blanch AR, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Tiainen T, Vigneulle M, Swings J. 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes *et al.* 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *et al.*, 1981. International Journal of Systematic Bacteriology 48:749-758.
- Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, Elf J, Gerdes K, Ehrenberg M. 2003. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. Cell 112:131-140.
- Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Coelho PMZ, Lima WS, Negrao-Correa D. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. Acta Tropica. 2006. 98:224-33.
- Perez DG, Fontanetti CS. 2011. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. Environmental Monitoring and Assessment 177:437-447.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29.
- Phianphak W, Rengpipat S, Rukpratanporn S, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul W, Sithigorngul P. 2005. Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. Diseases of Aquatic Organisms 63:161-168.
- Pipe RK. 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. The Histochemical Journal 22:595-603.
- Poulin R, Mouritsen KN. 2006. Climate change, parasitism and the structure of intertidal ecosystems. Journal of Helminthology 80:183-191.
- Prado S, Romalde JL, Barja JL. 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. Veterinary Microbiology 145:187-197.
- Prado-Alvarez M, Gestal C, Novoa B, Figueras A. 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. Fish & Shellfish Immunology 26:72-83.
- Premachandra HKA, Wan Q, Elvitigala DAS, De Zoysa M, Choi CY, Whang I, Lee J. 2012. Genomic characterization and expression profiles upon bacterial infection of a novel cystatin B homologue from disk abalone (*Haliotis discus discus*). Developmental and Comparative Immunology 38:495-504.
- Pushpamali WA, De Zoysa M, Kang HS, Oh CH, Whang I, Kim SJ, Lee J. 2008. Comparative study of two thioredoxin peroxidases from disk abalone (*Haliotis discus discus*):

Cloning, recombinant protein purification, characterization of antioxidant activities and expression analysis. *Fish & Shellfish Immunology* 24:294-307.

R

- Radashevsky VI, Olivares C. 2005. *Polydora uncinata* (Polychaeta : Spionidae) in Chile: an accidental transportation across the Pacific. *Biological Invasions* 7:489-496.
- Rafinesque CS. 1815. *Analyse de la nature ou tableau de l'univers et des corps organisés*. Palerme.
- Raimondi F, Kao JPY, Fiorentini C, Fabbri A, Donelli G, Gasparini N, Rubino A, Fasano A. 2000. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in in vitro systems. *Infection and Immunity* 68:3180-3185.
- Raimondi PT, Wilson CM, Ambrose RF, Engle JM, Minchinton TE. 2002. Continued declines of black abalone along the coast of California: are mass mortalities related to El Nino events? *Marine Ecology Progress Series* 242:143-152.
- Reeve LA. 1846. Monograph of the genus *Haliotis*. In: Reeve B, editor. *Conchologia Iconica*. London.
- Reichelt JL, Baumann P. 1973. Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Archives of Microbiology* 94:283-330.
- Ren HL, Xu DD, Gopalakrishnan S, Qiao K, Huang WB, Wang KJ. 2009. Gene cloning of a sigma class glutathione S-transferase from abalone (*Haliotis diversicolor*) and expression analysis upon bacterial challenge. *Developmental and Comparative Immunology* 33:980-990.
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menasaveta P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). *Aquaculture* 191:271-288.
- Respondek M, Buts L, De Jonge N, Haesaerts S, Loris R, Van Melderen L, Wyns L, Zangger K. 2009. Sequence-specific H-1, N-15 and C-13 resonance assignments of the 23.7-kDa homodimeric toxin CcdB from *Vibrio fischeri*. *Biomolecular Nmr Assignments* 3:145-147.
- Ringo E, Olsen RE, Gifstad TO, Dalmo RA, Amlund H, Hemre GI, Bakke AM. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 16:117-136.
- Robertson PAW, Calderon J, Carrera L, Stark JR, Zherdmant M, Austin B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 32:151-155.
- Romero A, Novoa B, Figueras A. 2012. Genomics, immune studies and diseases in bivalve aquaculture. *Isj-Invertebrate Survival Journal* 9:110-121.
- Rosenberg E, Ben-Haim Y. 2002. Microbial diseases of corals and global warming. *Environmental Microbiology* 4:318-326.
- Roussel S, Huchette S, Clavier J, Chauvaud L. 2011. Growth of the European abalone (*Haliotis tuberculata* L.) in situ: Seasonality and ageing using stable oxygen isotopes. *Journal of Sea Research* 65:213-218.
- Royer C. 2009. Activités d'extraits de 7 macroalgues bretonnes sur la croissance des souches pathogènes *Vibrio harveyi* et *V. tapetis*. Rapport de stage de Master Sciences Biologiques Marines 1^{ère} année de l' Université de Bretagne Occidentale.

- Ruangpan L, Kitao T. 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Fish Diseases* 14:383-388.
- Rui HP, Liu Q, Wang QY, Ma Y, Liu H, Shi CB, Zhang YX. 2009. Role of Alkaline Serine Protease, Asp, in *Vibrio alginolyticus* Virulence and Regulation of Its Expression by LuxO-LuxR Regulatory System. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19:431-438.
- Ruwandeeepika HAD, Defoirdt T, Bhowmick PP, Karunasagar I, Bossier P. 2011a. Expression of virulence genes in luminescent and nonluminescent isogenic vibrios and virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Journal of Applied Microbiology* 110:399-406.
- Ruwandeeepika HAD, Defoirdt T, Bhowmick PP, Karunasagar I, Bossier P. 2011b. In vitro and in vivo expression of virulence genes in *Vibrio* isolates belonging to the *Harveyi* clade in relation to their virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Environmental Microbiology* 13:506-517.
- Ruwandeeepika HAD, Jayaweera TSP, Bhowmick PP, Karunasagar I, Bossier P, Defoirdt T. 2012. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. *Reviews in Aquaculture* 4:59-74.

S

- Salamat Z, Sullivan JT. 2009. Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *Developmental and Comparative Immunology* 33:725-727.
- Sales J, Britz PJ. 2001. Research on abalone (*Haliotis midae* L.) cultivation in South Africa. *Aquaculture Research* 32:863-874.
- Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* NY.
- Sano Y, Kageyama M. 1981. Purification and properties of an S-type pyocin, pyocin AP41. *Journal of bacteriology* 146:733-739.
- Sar N, McCarter L, Simon M, Silverman M. 1990. Chemotactic control of the 2 flagellar systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 172:334-341.
- Sato-Okoshi W, Okoshi K, Koh BS, Kim YH, Hong JS. 2012. Polydorid species (Polychaeta: Spionidae) associated with commercially important mollusk shells in Korean waters. *Aquaculture* 350:82-90.
- Sato-Okoshi W, Okoshi K, Shaw J. 2008. Polydorid species (Polychaeta : Spionidae) in southwestern Australian waters with special reference to *Polydora uncinata* and *Boccardia knoxi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88:491-501.
- Saulnier D, De Decker S, Haffner P. 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods* 77:191-197.
- Sawabe T, Inoue S, Fukui Y, Yoshie K, Nishihara Y, Miura H. 2007a. Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes and Environments* 22:300-308.
- Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL. 2007b. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *Journal of Bacteriology* 189:7932-7936.

- Schikorski D, Renault T, Paillard C, Bidault-Toffin A, Tourbiez D, Saulnier D. In press. Development of Taqman Real-Time PCR assay targeting both the marine bacteria *Vibrio harveyi*, a pathogen of European abalone *Haliotis tuberculata*, and plasmidic DNA harbored by virulent strains. Aquaculture.
- Schikorski D. 2010. European project SUDEVAB, Workpackage 4 : Pathology.
- Schlesinger MJ. 1990. Heat-Shock proteins. Journal of Biological Chemistry 265:12111-12114.
- Schmidt G. 2011. *Yersinia enterocolitica* outer protein T (YopT). European Journal of Cell Biology 90:955-958.
- Schuster SC. 2008. Next-generation sequencing transforms today's biology. Nat Meth 5:16-18.
- Selvin J, Lipton AP. 2003. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms 57:147-150.
- Selvin J, Manilal A, Sujith S, Kiran GS, Lipton AP. 2011. Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. Latin American Journal of Aquatic Research 39:197-204.
- Seo Y, Galloway DR. 1990. Purification of the pyocin S2 complex from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Analysis of DNase activity. Biochemical and biophysical research communications 172:455-461.
- Shalon D, Smith SJ, Brown PO. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. Genome Research 6:639-645.
- Shime-Hattori A, Iida T, Arita M, Park KS, Kodama T, Honda T. 2006. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. Fems Microbiology Letters 264:89-97.
- Shinoda S. 1999. Protein toxins produced by pathogenic vibrios. Journal of Natural Toxins 8:259-269.
- Shinoda S, Yakiyama I, Yasui S, Kim Y, Ono B, Nakagami S. 1992. Lateal flagella of Vibrios - serological classification and genetic similarity. Microbiology and Immunology 36:303-309.
- Shuvaeva TM, Novoselov VI, Fesenko EE, Lipkin VM. 2009. Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. Russian Journal of Bioorganic Chemistry 35:523-537.
- Shyu YC, Chiu CC, Lin FP. 1999. Cloning, sequencing, expression and characterization of the manganese superoxide dismutase gene from *Vibrio alginolyticus*. Biochemistry and Molecular Biology International 47:803-814.
- Silva-Aciaras FR, Carvajal PO, Mejias CA, Riquelme CE. 2011. Use of macroalgae supplemented with probiotics in the *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) culture in Northern Chile. Aquaculture Research 42:953-961.
- Simon CA, Kaiser H, Britz PJ. 2004. Infestation of the abalone, *Haliotis midae*, by the sabellid, *Terebrasabella heterouncinata*, under intensive culture conditions, and the influence of infestation on abalone growth. Aquaculture 232:29-40.
- Simon CA, Ludford A, Wynne S. 2006. Spionid polychaetes infesting cultured abalone *Haliotis midae* in South Africa. African Journal of Marine Science 28:167-171.
- Sirirustananun N, Chen JC, Lin YC, Yeh ST, Liou CH, Chen LL, Sim SS, Chiew SL. 2011. Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 31:848-855.

- Sithigorngul W, Rengpipat S, Tansirisittikul A, Rukpratanporn S, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul P. 2006. Development of monoclonal antibodies for simple identification of *Vibrio alginolyticus*. *Letters in Applied Microbiology* 43:436-442.
- Sloan NA, Breen PA. 1988. Northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*, in British Columbia: fisheries and synopsis of life history information: Department of Fisheries and Oceans.
- Smith L. 1955. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. *Methods of biochemical analysis* 2:427.
- Snieszko SF. 1973. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6:197-208.
- Snyder MJ, Girvetz E, Mulder EP. 2001. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41:22-29.
- Soderhall K, Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28.
- Song Z, Ji R, Yan S, Chen C, Zong Y, Jiang Y, Ni Z. 2000. A spherovirus resulted in mass mortality of *Haliotis diversicolor aquatilis*. *Journal of Fisheries of China* 24:463-466.
- Soudant P, Leite R, Chu FLE, Villalba A, Cancela L. 2008. Bivalves-Perkinsus spp. interactions. In: Villalba AE, editor. Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry. Vilanova de Arousa, Spain.
- Spearman C. 1904. The proof and measurement of association between two things. *The American journal of psychology* 15:72-101.
- Sperstad SV, Haug T, Blencke HM, Styrvold OB, Li C, Stensvag K. 2011. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnology Advances* 29:519-530.
- Stephenson TA. 1924. Notes on *Haliotis tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (New Series)* 13:480-495.
- Storey KB. 1998. Survival under stress: molecular mechanisms of metabolic rate depression in animals. *South African Journal of Zoology* 33:55-64.
- Storey KB. 2006. Molecular mechanisms of anoxia tolerance. *Animals and Environments* 1275:47-54.
- Storey KB, Storey JM. 2007. Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause' - molecular regulation of hypometabolism. *Journal of Experimental Biology* 210:1700-1714.
- Stork M, Di Lorenzo M, Welch TJ, Crosa LM, Crosa JH. 2002. Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* 48:222-228.
- Strom MS, Paranjpye RN. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection* 2:177-188.
- Sudheesh PS, Xu HS. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196:37-46.
- Sun BG, Zhang XH, Tang XX, Wang SS, Zhong YB, Chen JX, Austin B. 2007. A single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity for turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Bacteriology* 189:2575-2579.
- Svendsen YS & Bogwald J (1997) Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 317-325.

Svitil AL, Chadhain SMN, Moore JA, Kirchman DL. 1997. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Applied and Environmental Microbiology* 63:408-413.

T

- Takahashi H, Hara-Kudo Y, Miyasaka J, Kumagai S, Konuma H. 2005a. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Microbiological Methods* 61:77-85.
- Takahashi H, Iwade Y, Konuma H, Hara-Kudo Y. 2005b. Development of a quantitative real-time PCR method for estimation of the total number of *Vibrio parahaemolyticus* in contaminated shellfish and seawater. *Journal of Food Protection* 68:1083-1088.
- Takami H, Kawamura T. 2003. Dietary changes in the abalone, *Haliotis discus hannai*, and relationship with the development of the digestive organ. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly* 37:89-98.
- Tan JM, Lancaster M, Hyatt A, van Driel R, Wong F, Wamer S. 2008. Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis spp.*) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *Journal of Virological Methods* 149:338-341.
- Tanaka R, Sugimura I, Sawabe T, Yoshimizu M, Ezura Y. 2003. Gut microflora of abalone *Haliotis discus hannai* in culture changes coincident with a change in diet. *Fisheries Science* 69:951-958.
- Tanguy A, Guo XM, Ford SE. 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C-gigas*) oysters. *Gene* 338:121-131.
- Teasdale ME, Liu JY, Wallace J, Akhlaghi F, Rowley DC. 2009. Secondary Metabolites Produced by the Marine Bacterium *Halobacillus salinus* That Inhibit Quorum Sensing-Controlled Phenotypes in Gram-Negative Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75:567-572.
- Terahara K, Takahashi KG. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Current Pharmaceutical Design*. 2008. 14:131-7.
- ten Doeschate KI, Coyne VE. 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284:174-179.
- Thompson FL, Austin B, Swings J. 2006. *The biology of vibrios.*: American Society of Microbiology press, Washington D.C.
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB, Swings J. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5107-5115.
- Thompson FL, Gomez-Gil B, Vasconcelos ATR, Sawabe T. 2007. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V-campbellii* are distinct species. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4279-4285.
- Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Engelbeen K, Denys R, Swings J. 2002. *Vibrio trachuri* Iwamoto *et al.* 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *et al.* 1981. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:973-976.
- Thompson FL, Iida T, Swings J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:403-+.

- Tinajero MD, Caceres-Martinez J, Aviles JGG. 2002. Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research* 21:825-830.
- Tiscar PG, Mosca F. 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Veterinary Research Communications* 28:57-62.
- Travers M, Bidault-Toffin A, Barbou A, Schikorski D, Huchette S, Paillard C, Koken M. submitted. pVCR1, a *Vibrio harveyi* plasmid specifically found in strains pathogenic for the European abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758. *Journal of Molecular Biology*.
- Travers MA. 2008. Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata* : approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. In: IUEM: Université de Bretagne Occidentale.
- Travers MA, Barbou A, Le Goic N, Huchette S, Paillard C, Koken M. 2008a. Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *Fems Microbiology Letters* 289:34-40.
- Travers MA, Basuyaux O, Le Goic N, Huchette S, Nicolas JL, Koken M, Paillard C. 2009a. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology* 15:1365-1376.
- Travers MA, Basuyaux O, Nicolas JL, Friedman C, Huchette S, Koken M, Paillard C. 2008b. Temperature dependent vibriosis of the European abalone, *Haliotis tuberculata*. *Journal of Shellfish Research* 27:1058-1058.
- Travers MA, da Silva PM, Le Goic N, Marie D, Donval A, Huchette S, Koken M, Paillard C. 2008c. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 24:400-411.
- Travers MA, Le Bouffant R, Friedman CS, Buzin F, Cougard B, Huchette S, Koken M, Paillard C. 2009b. Pathogenic *Vibrio harveyi*, in Contrast to Non-Pathogenic Strains, Intervenes With the p38 MAPK Pathway to Avoid an Abalone Haemocyte Immune Response. *Journal of Cellular Biochemistry* 106:152-160.
- Travers MA, Le Goic N, Huchette S, Koken M, Paillard C. 2008d. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25:800-808.
- Travers MA, Meistertzheim AL, Cardinaud M, Friedman CS, Huchette S, Moraga D, Paillard C. 2010. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *Journal of Invertebrate Pathology* 105:289-297.
- Tyagi A, Saravanan V, Karunasagar I. 2009. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in tropical shellfish by SYBR green real-time PCR and evaluation of three enrichment media. *International Journal of Food Microbiology* 129:124-130.

U-V

- Umasuthan N, Revathy KS, Lee Y, Whang I, Choi CY, Lee J. 2012. A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 155:539-550.

- van der Merwe M, Franchini P, Roodt-Wilding R. 2011. Differential Growth-Related Gene Expression in Abalone (*Haliotis midae*). *Marine Biotechnology* 13:1125-1139.
- Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology* 35:182-188.
- Van Melderen L. 2010. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Current Opinion in Microbiology* 13:781-785.
- van Valen L. 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1:1-30.
- Vandenbergh J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Balladares M, Gomez-Gil B, Calderon J, Sorgeloos P, Swings J. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2592-2597.
- Vaseeharan B, Ramasamy P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology* 36:83-87.
- Vattanaviboon P, Panmanee W, Mongkolsuk S. 2003. Induction of peroxide and superoxide protective enzymes and physiological cross-protection against peroxide killing by a superoxide generator in *Vibrio harveyi*. *Fems Microbiology Letters* 221:89-95.
- Veiga E, Cossart P. 2006. The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends in Cell Biology* 16:499-504.
- Vilches S, Wilhelms M, Yu HB, Leung KY, Tomas JM, Merino S. 2008. *Aeromonas hydrophila* AH-3 AexT is an ADP-ribosylating toxin secreted through the type III secretion system. *Microbial Pathogenesis* 44:1-12.
- Vilchis LI, Tegner MJ, Moore JD, Friedman CS, Riser KL, Robbins TT, Dayton PK. 2005. Ocean warming effects on growth, reproduction, and survivorship of Southern California abalone. *Ecological Applications* 15:469-480.
- Vinod MG, Shivu MM, Umesha KR, Rajeeva BC, Krohne G, Ka-Unasagar I, Karunasagar I. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255:117-124.
- Virgin HW. 2007. In vivo veritas: pathogenesis of infection as it actually happens. *Nature Immunology* 8:1143-1147.
- Volety AK, McCarthy SA, Tall BD, Curtis SK, Fisher WS, Genthner FJ. 2001. Responses of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes to environmental and clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquatic Microbial Ecology* 25:11-20.
- von Linné C. 1759. *Systema naturae: per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*: Salvius.
- Vouras C, Dailianis S. 2012. Evidence for phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI3-kinase) involvement in Cd-mediated oxidative effects on hemocytes of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 155:587-593.

W-

- Wan Q, Whang I, Lee J. 2008. Molecular cloning and characterization of three sigma glutathione S-transferases from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 151:257-267.

- Wang B, Li X, Gou C. 1997. Infection of spherical viruses from *Haliotis discus hannai* Ino. *Virologica Sinica* 12:360-363.
- Wang GD, Zhang KF, Zhang ZP, Zou ZH, Jia XW, Wang SH, Lin P, Wang YL. 2008a. Molecular cloning and responsive expression of macrophage expressed gene from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Fish & Shellfish Immunology* 24:346-359.
- Wang JY, Guo ZX, Feng J, Liu GF, Xu LW, Chen BS, Pan JP. 2004a. Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong Province, China. *Journal of Shellfish Research* 23:1163-1168.
- Wang KJ, Ren HL, Xu DD, Cai L, Yang M. 2008b. Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 32:1326-1347.
- Wang N, Whang I, Lee J. 2008c. A novel C-type lectin from abalone, *Haliotis discus discus*, agglutinates *Vibrio alginolyticus*. *Developmental and Comparative Immunology* 32:1034-1040.
- Wang QY, Liu Q, Ma Y, Zhou LY, Zhang YX. 2007. Isolation, sequencing and characterization of cluster genes involved in the biosynthesis and utilization of the siderophore of marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Archives of Microbiology* 188:433-439.
- Wang SH, Wang YL, Zhang ZX, Jack R, Weng ZH, Zou ZH, Zhang ZP. 2004b. Response of innate immune factors in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* to pathogenic or nonpathogenic infection. *Journal of Shellfish Research* 23:1173-1177.
- Wang YB, Li JR, Lin JD. 2008d. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281:1-4.
- Wang YJ, Hu MH, Cheung SG, Shin PKS, Lu WQ, Li JL. Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity. *Aquaculture*. 2012. 356:22-9.
- Wayne LG. 1988. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Systematic and Applied Microbiology* 10:99-100.
- Wetchateng T, Friedman CS, Wight NA, Lee PY, Teng PH, Sriurairattana S, Wongprasert K, Withyachumnarnkul B. 2010. Withering syndrome in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Diseases of Aquatic Organisms* 90:69-76.
- Whitaker WB, Parent MA, Naughton LM, Richards GP, Blumerman SL, Boyd EF. 2010. Modulation of Responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and Temperature Stresses by Growth at Different Salt Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 76:4720-4729.
- Wiens M, Korzhev M, Krasko A, Thakur NL, Perovic-Ottstadt S, Breter HJ, et al. Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway - Induction of a perforin-like molecule. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280:27949-59.
- Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking by ranking methods. *Biometrics Bulletin*. 1945. 1:80-3.
- Wilmore DW, Shabert JK. 1998. Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition* 14:618-626.
- Wright AC, Simpson LM, Oliver JD. 1981. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infection and Immunity* 34:503-507.
- Wu CL, Mai KS, Zhang WB, Ai QH, Xu W, Wang XJ, Ma HM, Liufu ZG. 2010. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of selenium-dependent glutathione

peroxidase from abalone *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium, zinc and iron. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 152:121-132.

Y-Z

- Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. 2011. Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Annual Review Genetics*, Vol 45 45:61-79.
- Yamaichi Y, Duigou S, Shakhnovich EA, Waldor MK. 2009. Targeting the Replication Initiator of the Second *Vibrio* Chromosome: Towards Generation of Vibrionaceae-Specific Antimicrobial Agents. *Plos Pathogens* 5.
- Yamamoto S, Okujo N, Yoshida T, Matsuura S, Shinoda S. 1994. Structure and iron transport activity of vibioferrin, a new siderophore of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Biochemistry* 115:868-874.
- Yi JB, Chen Q, Zou WZ, Yan QP, Zhuang ZX, Wang XR. 2008. Starvation effects on pathogenic *Vibrio alginolyticus* in natural seawater. *Acta Oceanologica Sinica* 27:120-129.
- Yoshizawa S, Tsuruya Y, Fukui Y, Sawabe T, Yokota A, Kogure K, Higgins M, Carson J, Thompson FL. 2012. *Vibrio jasicida* sp nov., a member of the *Harveyi* clade, isolated from marine animals (packhorse lobster, abalone and Atlantic salmon). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:1864-1870.
- Yu JH, Choi MC, Park KI, Park SW. Effects of Anoxia on Immune Functions in the Surf Clam *Macra veneriformis*. *Zoological Studies*. 2010. 49:94-101.
- Yuan J, Sterckx Y, Mitchenall LA, Maxwell A, Loris R, Waldor MK. 2010. *Vibrio cholerae* ParE2 Poisons DNA Gyrase via a Mechanism Distinct from Other Gyrase Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 285:40397-40408.
- Yuan J, Yamaichi Y, Waldor MK. 2011. The Three *Vibrio cholerae* Chromosome II-Encoded ParE Toxins Degrade Chromosome I following Loss of Chromosome II. *Journal of Bacteriology* 193:611-619.
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *Bmc Bioinformatics*. 2006. 7.
- Zahoor Z, Davies AJ, Kirk RS, Rollinson D, Walker AJ. 2008. Disruption of ERK signalling in *Biomphalaria glabrata* defence cells by *Schistosoma mansoni*: Implications for parasite survival in the snail host. *Developmental and Comparative Immunology* 32:1561-1571.
- Zelck UE, Gege BE, Schmid S. 2007. Specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase and P13-K pathways impair immune responses by hemocytes of trematode intermediate host snails. *Developmental and Comparative Immunology* 31:321-331.
- Zen-Yoji H, Le Clair RA, Ota K, Montague TS. 1973. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* cultures isolated in the United States with those isolated in Japan. *The Journal of infectious diseases* 127:237-241.
- Zhang JZ, Chai JH. 1995. Methods for finding new genes in positional cloning. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 22:126-132.
- Zhang XH, Austin B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases* 23:93-102.
- Zhang XH, Meaden PG, Austin B. 2001a. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3161-3167.

- Zhang ZX, Wang J, Su YQ, Yan QP, Chi XC, Zhou HM, Zhou YC. 2001b. Pathogeny and histopathology of the epidemic disease in *Haliotis diversicolor supertexta*. Journal of Xiamen University(Natural Science) 40:949-953.
- Zhao JJ, Chen C, Luo P, Ren CH, Jiang X, Zhao Z, Hu CQ. 2011. SYBR Green I-based real-time PCR targeting the rpoX gene for sensitive and rapid detection of *Vibrio alginolyticus*. Molecular and Cellular Probes 25:137-141.
- Zhao Z, Chen C, Hu CQ, Ren CH, Zhao JJ, Zhang LP, Jiang XA, Luo P, Wang QB. 2010. The type III secretion system of *Vibrio alginolyticus* induces rapid apoptosis, cell rounding and osmotic lysis of fish cells. Microbiology-Sgm 156:2864-2872.
- Zhou S, Hou Z, Li N, Qin Q. 2007. Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. Journal of Applied Microbiology 103:1897-1906.

Résumé

Depuis une quinzaine d'années, des mortalités estivales d'ormeaux européens, *Haliotis tuberculata*, surviennent sur le littoral breton et normand, et en structures aquacoles. Ces mortalités sont attribuées à l'espèce bactérienne *Vibrio harveyi*, et se produisent chez des ormeaux sexuellement matures lorsque la température de l'eau dépasse 17°C.

Ce travail de thèse visait une approche multifactorielle de l'étude de cette interaction hôte-parasite, afin de spécifier les conditions intrinsèques aux ormeaux dans le déclenchement de cette vibriose, le cycle infectieux de *V. harveyi* chez l'ormeau européen et le rôle de la température dans l'accomplissement de ce cycle infectieux, et enfin la réponse physiologique de l'ormeau lors d'une exposition à *V. harveyi*.

Les principaux résultats montrent un différentiel d'expression génomique entre des ormeaux résistants et des ormeaux sensibles au cours d'une exposition à *V. harveyi*, attestant ainsi l'importance du statut physiologique de l'hôte dans la survie à la vibriose chez l'ormeau européen. Il a également été mis en évidence la sensibilité d'ormeaux sexuellement immatures, habituellement résistants, acclimatés à 19°C et exposés à des conditions contraignantes de type manipulation. Par ailleurs, l'étude de la voie d'entrée et de la dynamique d'infection de *V. harveyi* chez l'ormeau européen a révélé un tropisme particulier de ce vibriion pathogène vers les tissus branchiaux dès les premières heures de contact, et son invasion dans le système circulatoire dès 24h de contact. L'étude de la réponse hémostatique des ormeaux et du métabolisme branchial, à l'échelle moléculaire et cellulaire, lors des premières heures de contact, démontre 1/ la genèse d'un stress oxydatif au niveau des branchies d'ormeaux sensibles à la vibriose et 2/ une altération du fonctionnement des hémocytes, ce qui présume de l'une des stratégies majeures de virulence de *V. harveyi*.

Abstract

For fifteen years, summer mortalities have been observed in wild and farmed populations of European abalone, *Haliotis tuberculata*, along the north French coast. These mortalities are attributed to the bacterial species *Vibrio harveyi* and occur in sexually mature animals, when the seawater temperature exceeds 17°C.

A multifactorial approach to the study of this host-parasite interaction was done during this thesis, in order to specify the intrinsic abalone conditions in vibriosis mortalities, the infectious cycle of *V. harveyi* in European abalone and the role of temperature in the fulfillment of this infectious cycle, and finally the physiological response of abalone, at cellular and molecular level, when exposed to *V. harveyi*.

The main results showed a differential gene expression between resistant and susceptible abalone during exposure to *V. harveyi*, indicating the importance of the physiological status of the host, in survival to vibriosis. This hypothesis is supplemented by the susceptibility of sexually immature abalone at 19°C to this disease, usually resistant, and exposed to manipulation stressor. Moreover, the study of the portal of entry and the dynamics of infection by *V. harveyi* in European abalone revealed a particular tropism of this vibrio pathogen for gill tissues, in the earlier hours of contact, and its invasion into the circulatory system from the first 24 hours of contact. The study of the response of abalone hemocyte and gill metabolism, at the cellular and molecular level, in the earlier hours of contact, shows 1/ a genesis of oxidative stress in gills of susceptible abalone, and 2/ an alteration of hemocyte functions, which may constitute one of the major strategies of virulence in *V. harveyi*.