REPAMEP

REPONSE DES PALOURDES AUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX COMBINANT METAUX, EFFLORESCENCES TOXIQUES ET PATHOGENES

MANILA CLAM RESPONSE TO ENVIRONMENTAL STRESS COMBINING METALS, TOXIC BLOOMS AND PATHOGENS

Programme LITEAU
Rapport scientifique final

Coordination Scientifique :
Université Bordeaux 1 – CNRS, UMR 5805 EPOC
Xavier de Montaudouin, MCU-HDR
Station Marine d'Arcachon
2, rue du Pr Jolyet F-33120 Arcachon
x.de-montaudouin@epoc.u-bordeaux1.fr
Téléphone : 05 56 22 39 04
Télécopie : 05 56 83 86 51

N° de contrat : L.11-6778
Date de notification du contrat : 27/11/2009 avenant au 30/04/2013
Date de remise du rapport: 29 mars 2013.

PARTICIPANTS AU PROJET

Les principaux rédacteurs :

M. Baudrimont
P. Gonzalez
H. Hégaret
A. Khayati
P. Lassus
A. Legeay
X. de Montaudouin
N. Raymond
P. Soudant
D. Tran

Et tous les autres sans qui rien n'aurait été fait :

Abraham J
Amzil Z
Bardouil M
Binias B.
Bourasseau L
Brémont M
Bunel M
Daffe G
Dang C
Do VT
Donaghy L
Duck MC
Dudognon T
Fernandez S
Garabétian F
Girault E
Henry N
Heude C
Jude-Lemeilleur F
Juguelin H
Kellner K
Kraffe E
Lambert C
Landemaine A
Lassudrie M
Le Croizier G
Le Goïc N
Letort L
Lucia M
Marcaillou C
Mehdioub W
Meisterhans G
Mesmer-Dudons N
Merour E
Paul-Pont I
Plus M
Prince F
Rocher C
Savoye N
Sechet V
Sibat M
Thibaud A
Truquet P

Et merci à Daniel Guiral pour ses remarques constructives tout au long du projet

RESUMES COURTS

RESUME

L'originalité de ce projet réside dans le développement d'une approche interdisciplinaire intégrant l'impact des efflorescences d'algues toxiques et la pollution métallique sur la biologie (comportement, stress, immunité, génétique) et le développement des maladies d'un bivalve fouisseur d'intérêt économique, la palourde.

La palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* est la seconde espèce de bivalve exploitée dans le monde. Espèce introduite dans le bassin d'Arcachon dans les années 1980, elle soutient aujourd'hui une pêche professionnelle forte de 57 licences. Cependant, ces cinq dernières années ont vu le stock chuter. Outre la pêche, un certain nombre de maladies se présentent comme menace potentielle, notamment la perkinsose et la maladie du muscle marron (BMD). Le projet confirme l'installation de ces pathologies à des niveaux élevés de prévalence et d'intensité, impactant la croissance et l'indice de condition des palourdes. Perkinsose comme BMD sont favorisés sur les estrans les plus émergeants et sur les zones à plus faible renouvellement d'eau (secteur nord-ouest). L'hypothèse d'un agent pathogène de la BMD de nature virale reste forte, même si la démonstration n'a encore pu être faite. Si les palourdes du bassin d'Arcachon concentrent peu de toxines d'origine phytoplanctoniques (2010-11), la présence de spirolides suffit à justifier les expériences de contamination croisées menées dans ce projet. Au-delà des défis techniques (cultures d'algues toxiques, multiplicité des traitements et des mesures), ce projet a mis en évidence des atteintes histologiques, immunitaires, comportementales et moléculaires liées à la contamination « algues toxiques » et/ou « métaux ». L'expertise acquise a été en partie possible grâce à une aide technique du Comité des Pêches et, en retour, a permis d'orienter le Comité dans certaines de ses stratégies.

MOTS CLES

PALOURDE JAPONAISE, PATHOLOGIE, EFFLORESCENCES TOXIQUES, INTERACTIONS MICROBIENNES, ECOTOXICOLOGIE, MULTISTRESS

ABSTRACT

The originality of this project consists in the interdisciplinary approach gathering the impact of toxic phytoplankton blooms and metallic pollution on health (behaviour, stress, immunity, genetic) and disease development of the Manila clam, an economically important species.

The Manila clam *Ruditapes philippinarum* is the second exploited bivalve in the world. It was introduced in Arcachon bay during the 80's and is today exploited by professional fishermen (57 licences). A 50% decrease of the stock was observed during the last five years. Beyond fishing pressure, a PhD thesis identified several diseases as potential threats, like perkinsosis (=Dermo) and brown muscle disease (BMD). The project confirms the settlement of these pathologies with high prevalence and intensity, impacting clams growth and condition index. Perkinsosis and BMD rather develop in elevated mudflats with lower water turnover (north-western area). The hypothesis that the BMD agent would be a virus is still valid although it had not been yet demonstrated. Phytoplanctonic related toxins in Manila clams remain very low but the occurrence of spirolids justifies our project to experiment multi-contamination. Beyond the technological challenges (toxic algae culture, multi-treatments and multi-responses protocol), this project highlighted effects of "toxic algae" and/or "metal" contamination on histological, immune, behavioural and molecular parameters. Our expertise was partly acquired with the assistance of the Fishing Committee and, in return, provided help this Committee for their own fishing strategies

KEY WORDS

MANILA CLAM, PATHOLOGY, TOXIC BLOOMS, MICROBIAL INTERACTIONS, ECOTOXICOLOGY, MULTISTRESS

SOMMAIRE

1 Introduction 6

2 Bilan des études sur les pathogènes/pathologies 9
2.1 Facteurs environnementaux corrélés au développement de la perkinsose et de la Maladie du Muscle Marron (BMD) 9
2.2 Interactions Perkinsus/BMD/palourdes 15
2.2.1 Dynamique *Perkinsus*/palourde 15
2.2.2 Impact de Perkinsus sur la croissance des palourdes 17
2.2.3 Dynamique BMD/palourde 18
2.2.4 Effet de la BMD sur la santé des palourdes 19
2.3 Recherche de l'agent infectieux de la BMD 23
2.3.1 Purification de l'agent étiologique 23
2.3.1.1 Purification sur gradient de sucrose 23
2.3.1.2 Purification sur coussin de sucrose et gradient de sucrose 24
2.3.2 Caractérisation moléculaire de l'agent infectieux et étude du développement de la BMD 25
2.3.2.1 Analyse protéique 25
2.3.2.2 Immunisation de souris et obtention d'anticorps polyclonaux 26
2.3.2.3 Adaptation à la culture cellulaire 26
2.3.2.4 Caractérisation génomique 27
2.3.3 Conclusions et Perspectives 28

3 Le microbiote des palourdes 29
3.1 Caractérisation des 2 habitats et des 2 sous-populations de palourdes considérés 29
3.1.1 Méthodologie 29
3.1.2 Résultats et Discussion 29
3.1.2.1 Deux habitats différenciés 29
3.1.2.2 Deux sous-populations de palourdes différentes 31
3.1.2.3 Conclusion 32
3.2 Spécificité des communautés bactériennes associées aux palourdes 32
3.2.1 Méthodologie 32
3.2.2 Résultats et Discussion 33
3.2.2.1 Empreinte génotypique de la collection d'isolats 33
3.2.2.2 Nombre de copies d'ADNr16S bactérien et abondance procaryote 35
3.2.2.3 Richesse en ITS 36
3.2.2.4 Diversité des communautés bactériennes 37
3.2.3 Conclusion 38
3.3 Influence de l'habitat sur la flore bactérienne 39
3.3.1 Méthodologie 39
3.3.2 Résultats et discussion 40
3.3.2.1 Dépuration 40
3.3.2.2 Réimplantation-transplantation 41
3.3.3 Conclusion 43
3.4 Conclusion générale 43

4 Ecotoxicologie : métaux et efflorescences toxiques 45
4.1 Contamination in situ (bassin d'Arcachon) 45
4.1.1 Contamination métallique 45

4.1.2 Contamination toxinique 55
4.2 Effets de contaminations simples et croisées sur la palourde : approche expérimentale 56
4.2.1 Impact des contaminants métalliques 56
4.2.1.1 Expérience préliminaire 56
4.2.1.2 Réponses génétiques, immunitaires et comportementales des palourdes exposées au cadmium (15µg/L) 57
4.2.1.3 Conclusion 63
4.2.2 Contamination toxinique 63
4.2.2.1 Impact d'une exposition à *Pseudo-nitzschia* multiseries 63
4.2.2.2 Impact d'une exposition à *Alexandrium ostenfeldii* sur la palourde 69
4.2.2.3 Conclusion 79
4.2.3 Impact combiné des contaminants métalliques et des algues toxiques 79
4.2.3.1 Méthodologie 79
4.2.3.2 Résultats et discussion 80
4.2.3.3 Conclusion 86

5 Développement – Amélioration – Optimisation des outils et des méthodes d'analyse 87

6 La vision du Comité des Pêches 90
6.1 Suivi des résultats scientifiques de REPAMEP 90
6.2 Apports des travaux de REPAMEP pour les structures professionnelles 91
6.2.1 Renforcement des relations entre laboratoires scientifiques et structures professionnelles sur le bassin d'Arcachon 91
6.2.2 Valorisation des travaux sur les pathologies et partenariats de travail 92

7 Conclusion générale 92
7.1 Bilan 92
7.2 Perspectives 94
7.2.1 Maladie du Muscle Marron (BMD) 94
7.2.2 Aspect microbiote 95
7.2.3 Aspect multistress 95

8 Références 96

9 Valorisation scientifique et pédagogique 102

1 Introduction

La palourde japonaise (*Ruditapes* (=*Venerupis*) *philippinarum*) a été introduite en France en 1972 par la Société ATlantique de MARiculture (SATMAR) à des fins conchylicoles (Flassch & Leborgne 1992). La forte capacité d'adaptation de la palourde japonaise à de nouveaux environnements ainsi que ses hautes performances de croissance ont entraîné une installation et une prolifération rapide de ce bivalve fouisseur. Parmi les sites français bénéficiant d'une étude de stock pour la palourde japonaise, le bassin d'Arcachon se situait jusqu'en 2012 à la 1ère place en termes de biomasse totale (7099 t) et de stock exploitable (721 t). Le stock exploitable est en continuel déclin (1159 t en 2008, 916 t en 2010) et s'accompagne d'une diminution effective des captures depuis le pic de 1027 t en 2007, avec 5-600 t ces dernières années (Sanchez et al. 2012).

Face à cette « crise halieutique », une thèse (Dang 2009) avait pour premier objectif de paramétrer la dynamique de la population de palourde japonaise dans le bassin d'Arcachon, en termes de croissance individuelle, de mortalité, de reproduction, de production/productivité. Ces travaux ont permis d'estimer la part de responsabilité de la pêche par rapport à celle de l'environnement. Par exemple, le défaut de palourde > 40 mm (taille minimum légale de capture au début de la thèse en 2006) est à la fois dû à la pêche qui écrête l'histogramme de taille mais aussi à un défaut de croissance, au moins passé une longueur de coquille de 30 mm (Dang et al. 2010b). Autre exemple, sur certains sites, la mortalité par pêche est du même ordre de grandeur que celle liée aux maladies (Dang & de Montaudouin 2009). Cette thèse a en effet également été l'occasion d'une part de faire le point sur un certain nombre de maladies connues mais d'autre part d'identifier une nouvelle pathologie, la Maladie du Muscle Marron (BMD en anglais). Concernant les maladies « connues », un état des lieux relativement exhaustif a permis de montrer que la maladie de l'anneau brun (MAB ou BRD en anglais) qui a sévi en Bretagne (Paillard & Maes 1994, Paillard et al. 1994, Paillard & Maes 1995, Paillard et al. 1997, Lassalle et al. 2007) est presqu'absente du bassin d'Arcachon, et de toute manière à une intensité faible (Dang 2009). Bien qu'espèce introduite et donc n'ayant pas co-évolué localement des parasites, la palourde japonaise n'est que légèrement infestée par des trématodes, macroparasites omniprésents chez les mollusques (Dang et al. 2009a). La faible infestation ne préjuge cependant pas de l'éventuelle pathogénicité, surtout pour un système hôte-parasites récent en termes de co-évolution. Un projet ANR (Multistress) avait notamment tenté d'évaluer expérimentalement l'impact de l'infestation par les trématodes sur la physiologie des palourdes (Paul-Pont 2010). Peu d'effets avaient été notés sur les paramètres immunitaires des palourdes, mais en revanche la synthèse de métallothionéines (protéines cytosoliques impliquées dans l'homéostasie, dans les mécanismes de détoxication, et sensibles à différents types de stress (Mouneyrac et al. 2000, Baudrimont et al. 2003, Amiard et al. 2006, Mao et al. 2012) était modifiée dans la glande digestive (Paul-Pont et al. 2010a, Paul-Pont et al. 2010b). Enfin, dans le registre des parasites communs, le protozoaire *Perkinsus olseni* a été recherché (Dang et al. 2010a). Il s'est avéré que les prévalences étaient très élevées (70 à 100% selon les sites) et l'intensité à un niveau considéré comme sublétal ($\approx 10^5$ cellules/g poids frais de branchie) (Villalba et al. 2004). **Avec un tel niveau d'infestation, la perkinsose se situait comme un facteur incontournable dans la description de la biologie des palourdes japonaises du bassin d'Arcachon. Du fait de cette omniprésence dans le bassin d'Arcachon impliquant la nécessité de travailler à l'échelle du système parasite-hôte, et après avoir recherché les facteurs environnementaux corrélés à son développement (§ 2.1) et avoir évalué l'impact direct de la présence de *Perkinsus* sur les palourdes (§ 2.2), nous avons continuellement choisi de considérer les possibles interactions entre la présence de ce protozoaire et la présence d'algues toxiques (§ 4.2.2), de métaux-traces (§ 4.2.1) et d'autres maladies (§ 2.2).**

Nos études sur les pathogènes avaient notamment montré, comme nous le verrons plus loin, l'importance de la prise en compte de différentes sources de stress pour se rapprocher des conditions environnementales et mieux comprendre les processus adaptatifs mis en jeu. Comme précédemment évoqué, les autopsies réalisées sur les palourdes avaient également permis d'identifier en 2005 une nouvelle pathologie, la Maladie du Muscle Marron (3M ou BMD) (Dang et al. 2008). Avec une prévalence moyenne variant entre 5% et 30% selon les secteurs (Dang et al. 2008), une atteinte structurelle sérieuse du muscle adducteur postérieur (Dang et al. 2009b,c), et une évidence d'effet délétère sur les palourdes (débutant par la remontée des individus à la surface du sédiment et finissant par la mort) (Dang & de Montaudouin 2009), **une étude exhaustive sur la palourde telle que proposée dans ce projet se devait de vérifier si cette pathologie est toujours d'actualité et dans quelles conditions environnementales (§ 2.1), quels sont les effets sur les palourdes en interaction avec l'incontournable parasite protozoaire *Perkinsus* (§ 2.2) et enfin, partie la plus risquée, identifier l'éventuel agent infectieux sur la base d'une présomption virale (Dang et al. 2009c) (§ 2.3).**

Dans le domaine des protistes, un certain nombre de microalgues marines peuvent également avoir une influence déterminante sur la faune environnante. Le phytoplancton toxique est ainsi reconnu pour ses effets majeurs sur l'écologie des zones côtières marines (Harvell et al. 1999 ; Lassus et al., 2007). Une efflorescence de phytoplancton toxique peut modifier la physiologie ou la biologie (mortalité, susceptibilité aux maladies et aux parasites, accumulation de toxines, etc.) de certaines espèces ou communautés importantes de la chaîne trophique qu'elles supportent, entraînant ainsi des changements dans les écosystèmes marins (Harvell et al. 1999). Ces efflorescences peuvent aussi avoir de forts impacts économiques et sanitaires, lors de la fermeture de la pêcherie ou de l'activité conchylicole du fait de la présence de toxines dans les organismes (dont les bivalves fouisseurs). Les bivalves fouisseurs du bassin d'Arcachon sont ainsi régulièrement exposés aux genres toxiques, *Dinophysis*, *Alexandrium*, et *Pseudo-nitzschia* (Ifremer 2011). Même si l'origine du phytoplancton n'est pas toujours clairement établie, diverses toxines (DSP, spirolides et PSP) sont détectées dans les tissus des bivalves. Ces toxines pourraient non seulement représenter un stress pour ces filtreurs (Haberkorn et al. 2010a & b, Tran et al. 2010, Haberkorn et al., 2011, Medhioub et al., 2012) mais aussi avoir une incidence sur les maillons trophiques supérieurs. A ce jour, les études concernant l'impact de ces efflorescences sur les animaux qui les subissent en première ligne restent limitées en nombre et sont souvent peu intégratives. Ce manque d'intégration est particulièrement pénalisant dans le cas des palourdes du bassin d'Arcachon qui, comme évoqué précédemment, sont déjà confrontées à des organismes intimement liés aux tissus, comme *Perkinsus olseni*. De véritables interactions peuvent donc être prévisibles, soit directes (*Perkinsus* vs. microalgue), soit indirectes par le déclenchement de mécanismes de protection du bivalve hôte par l'un ou/et l'autre des protagonistes (Hégaret et al. 2007a, Hégaret et al. 2009). **Au-delà des défis méthodologiques liés notamment à la culture de microalgues et au « contrôle » de leur toxicité, l'objectif était donc, après avoir vérifié la potentialité de la présence d'algues toxiques dans les palourdes du bassin d'Arcachon (§ 4.1.2), d'étudier expérimentalement la réponse des palourdes à ces microalgues. Ce projet tente de s'approcher des conditions locales, c'est-à-dire intègre le fait que les palourdes sont déjà infectées par des parasites (*Perkinsus*) (§ 2.2) et sont susceptibles d'être contaminées par un métal trace comme le cadmium (§ 4.1.1).**

Au-delà des parasites et des efflorescences toxiques, il est admis que les bivalves sont susceptibles d'abriter une flore procaryote abondante et diversifiée, dont la fonction reste encore globalement inconnue, mais s'intègre sans doute dans un spectre d'interactions allant de la présence accidentelle à la symbiose la plus exigeante. Notre postulat de départ était donc qu'une étude sur la santé d'une population telle celle des palourdes passait par la connaissance du microbiote associé qui pouvait aussi bien traduire un état de santé que l'expliquer (en partie) ou le prévoir. Les connaissances sur les échanges entre bivalves fouisseurs et communautés bactériennes sont en effet très fragmentaires à partir du moment où la thématique s'éloigne de l'aspect sanitaire. Les bivalves marins sont pourtant connus pour abriter une grande variété de micro-organismes et plus particulièrement de bactéries

potentiellement responsables d'altération(s) (Alderman et Jones 1971 ; Bricelj *et al.* 1992 ; Paillard & Maes 1995; Paillard. 2004). Cependant, la flore bactérienne et sa diversité chez ces animaux filtreurs restent mal caractérisées. En effet à part les travaux de Tanaka et al. (2003, 2004) sur l'ormeau *Haliotis* sp. et de Caro et al. (2007, 2009) sur la lucine *Codakia orbicularis* (bivalve) montrant l'existence de relations symbiotiques étroites avec respectivement la flore bactérienne du tractus digestif et des branchies, il existe peu de travaux portant sur la flore bactérienne associée aux bivalves fouisseurs. Cependant, de récentes études menées dans le bassin d'Arcachon ont montré que l'abondance totale des bactéries dans les bivalves est assez élevée pour envisager toute une gamme de relations symbiotiques (au sens large) palourdes/bactéries (neutralisme, commensalisme, mutualisme et/ou parasitisme) (Meisterhans et al. 2011). **Dans ce contexte nos questions concernaient principalement le déterminisme de la diversité bactérienne associée à différentes populations de palourdes en fonction des conditions environnementales (condition de l'hôte x caractéristiques de l'habitat) (§ 3).**

Au-delà des agents infectieux et des procaryotes, la masse d'eau est également le vecteur de polluants chimiques, notamment métalliques. Comme tous les milieux côtiers soumis à des pressions anthropiques, le bassin d'Arcachon subit des contaminations liées aux activités qui s'exercent dans la lagune ou sur son bassin versant. En particulier, les polluants métalliques peuvent se retrouver dans les eaux et les sédiments de la lagune, impactant potentiellement les organismes aquatiques qui s'y trouvent. Les bivalves filtreurs présentent de fortes capacités de bioaccumulation des éléments traces métalliques à l'origine de leur utilisation dans les réseaux de biosurveillance (Réseau d'Observation de la Contamination CHimique (ROCCH, ex-RNO)) (Baudrimont et al. 2005). Cependant, très peu d'études se sont réellement intéressées à l'état de contamination des bivalves filtreurs fouisseurs dans le bassin d'Arcachon (Baudrimont et al. 2006). **Après avoir estimé les teneurs en différents métaux traces sur plusieurs sites du bassin d'Arcachon (§ 4.1), l'effet de l'un d'eux (Cd) a été étudié, seul ou en interaction avec les microalgues toxiques (§ 4.2), et toujours dans le contexte local d'une pré-infestation élevée en parasites *Perkinsus*.**

Tout au long de cette introduction, la notion de « réponse » des palourdes à différentes situations a été avancée. Une large partie de ce projet s'est donc attelée à envisager un spectre aussi large que possible de réponses adaptives. Différents types de réponses biologiques (notamment de type dommages ou défenses) peuvent être déclenchées dans les tissus ou organes de façon à lutter ou à s'adapter à des stress qu'ils soient chimiques (métaux), biologiques (algues toxiques, bactéries, parasites) ou combinés (Baudrimont et al. 2005 ; Da Silva et al. 2008, Hégaret et al. 2007b).

Des mesures de l'immunité cellulaire (nombre d'hémocytes circulants, phagocytose, production d'espèces oxygénées réactives ERO, ...) et humorale (titre d'agglutination, phénoloxydase,..) permettent d'évaluer l'impact de stress chimiques et biologiques. La production de métallothionéines (MT), capables de séquestrer d'importantes quantités d'ions métalliques au niveau intra-cellulaire se doit d'être évaluée afin de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation et de résistance à la contamination métallique.

A cela s'ajoutent des réponses moléculaires de la palourde soumise aux contaminations métalliques et/ou toxiniques. Des approches de biologie moléculaire permettent de détecter et d'analyser les atteintes ou réponses adaptatives à travers l'expression de gènes, développées par les palourdes (Achard-Joris et al. 2006a,b). Les gènes étudiés concernent le métabolisme mitochondrial (sous-unité 1 de la cytochrome-C-oxydase, 12s), la réponse au stress oxydant (superoxide-dismutases cytoplasmique et mitochondriale, catalase) ou la détoxication cellulaire (métallothionéines).

Des paramètres biologiques moins spécifiques mais néanmoins intégrateurs que sont le comportement (enfouissement, activité valvaire) (Tran et al., 2002) et les activités alimentaires (taux de filtration, activité enzymatique) ont également été mesurés.

2 Bilan des études sur les pathogènes/pathologies

(Tâches 1.1, 1.2, 1.4, 2.1, 2.2 : C. Binias, V.T. Do, E. Merour, M. Lucia, **P. Gonzalez***, M. Brémont, M. Plus, C. Dang, K. Kellner, C. Heude, **X. de Montaudouin***)

2.1 *Facteurs environnementaux corrélés au développement de la perkinsose et de la Maladie du Muscle Marron (BMD)*

Objectifs : corréler la présence de maladies (perkinsose, BMD) chez la palourde aux paramètres environnementaux – Identifier les stations de référence pour les autres tâches.

2.1.1 Méthodologie

D'octobre à novembre 2009, trente-neuf stations ont été échantillonnées le long de 2 axes (représentatifs de 2 « sous-bassins » du bassin d'Arcachon) selon un gradient qui se voulait être « océan <-> continent ». Cette zone correspond à l'aire de distribution de la palourde japonaise.
A chaque station, six quadrats de 0,25 m² ont été utilisés pour ramasser à la main les palourdes. Des palourdes ont été trouvées dans 33 de ces stations qui seront les stations prises en compte dans les analyses. Quand le nombre d'individus était trop faible, d'autres palourdes ont été collectées au sein de la station concernée. L'abondance totale a été calculée. La gamme de longueur de coquille retenue pour le diagnostic des maladies était 28-36 mm. Le développement de la perkinsose a été estimé par la méthode RFTM (Ray Fluid Thioglycollate Medium) permettant de calculer le nombre de cellules de *Perkinsus* par gramme poids frais de branchie. Parallèlement, il a été démontré que cette grandeur était représentative du nombre total de *Perkinsus* sur le corps entier (**Figure 1**).

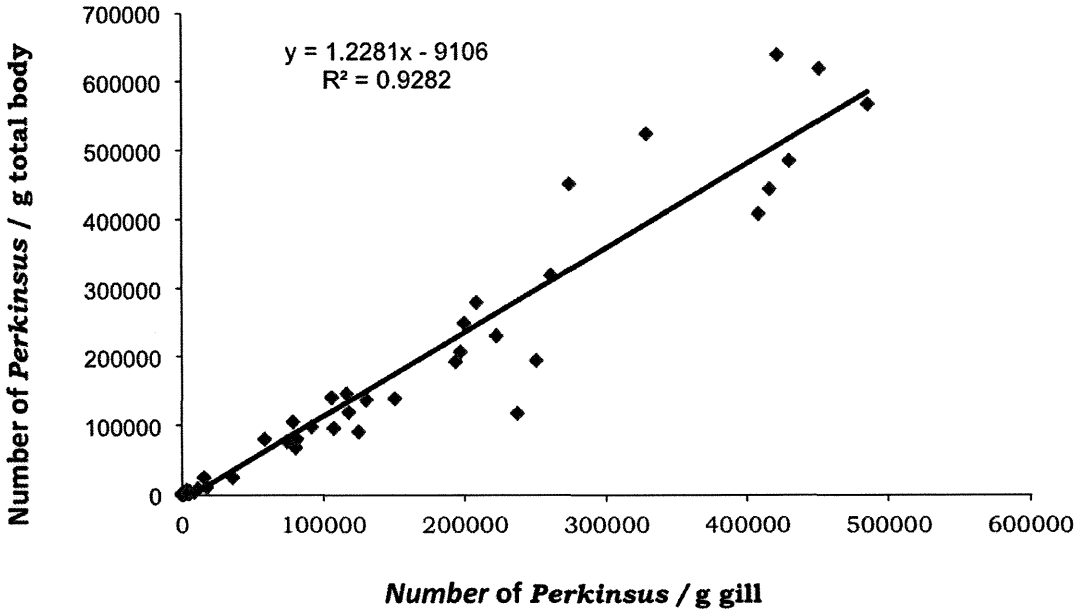


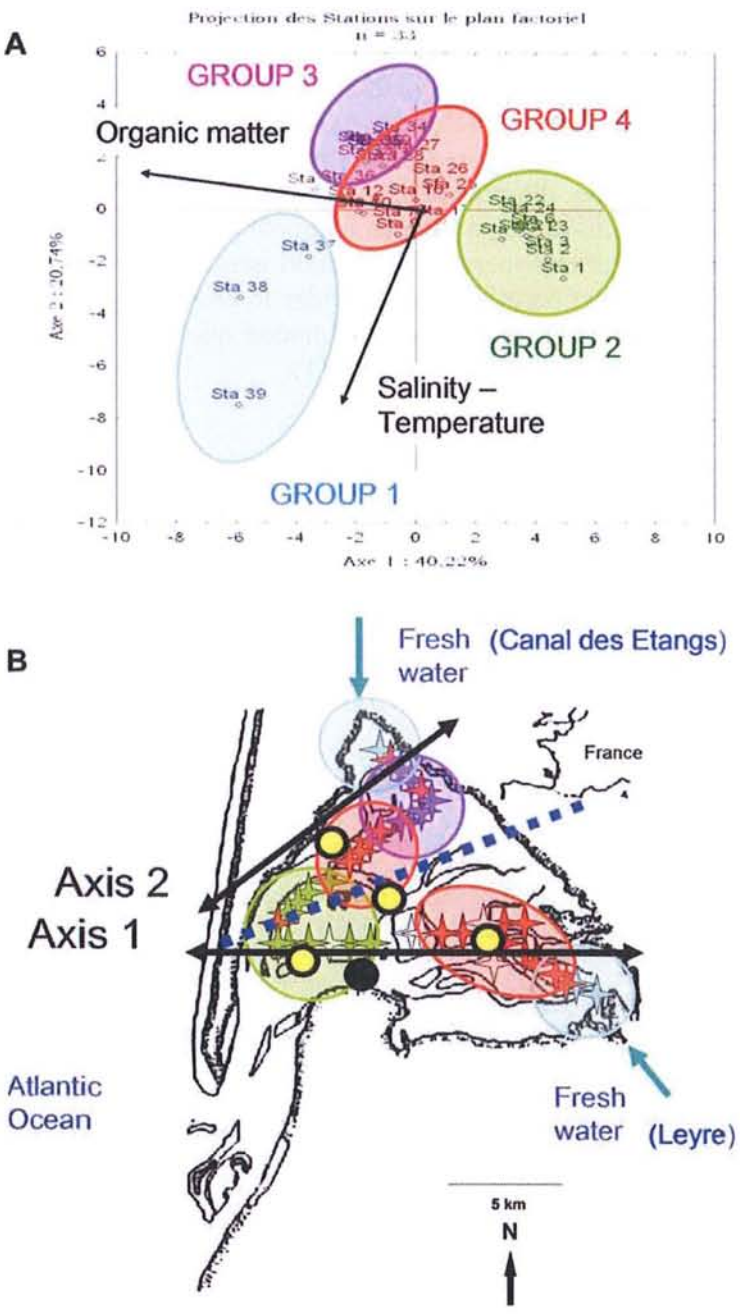
Figure 1: Nombre de cellules de *Perkinsus* dans la masse corporelle (par g poids frais, hors branchie) en fonction du nombre de cellule par g poids frais de branchie.

Concernant la Maladie du Muscle Marron (BMD), les palourdes ont été ouvertes pour mesurer le MPI (Muscle Print Index) sur le muscle postérieur (côté le plus touché). Ce MPI traduit le pourcentage de surface musculaire nécrosé (0 : muscle sain ; 1 : 0-25% nécrosé ; 2 : 25-50% ; 3 : 50-75% et 4 : 75-100%).

* Rédacteur principal

Par ailleurs, du sédiment a été prélevé dans les 2 premiers cm pour analyse granulométrique (sur colonne humide de tamis) et évaluation du pourcentage de matière organique (par perte au feu). La couverture de l'herbier a été évaluée par analyse d'images selon une méthode qui avait été mise au point lors du projet QuaLiF (Liteau 2) puis mise en pratique ici. Le principe est de corréler un nombre d'intersections entre des traits dessinés sur une photo et les feuilles de zostère et d'en déduire la biomasse de feuilles et le taux de couverture à partir d'équations établies au préalable (Binias et al. sous presse).
Concernant la température, la salinité et dans une moindre mesure le pourcentage d'émersion, la priorité était d'avoir des histogrammes de fréquences pour dégager non seulement des valeurs moyennes, mais également des évènements extrêmes. Ainsi, des estimations par modélisation ont été privilégiées (MARS, (Lazure & Dumas, 2008)).

2.1.2 Résultats et Discussion



Une analyse en composante principale (ACP) basée sur les différents paramètres environnementaux discrimine 4 groupes de stations (**Tableau 1, Figure 2**). Le groupe 1 rassemble les stations proche des tributaires (Leyre et Canal des Etangs) et donc caractérisées par une salinité moyenne plutôt faible (22,6), une fréquence plutôt importante de températures <16°C, des sédiments envasés et enrichis en matière organique, un temps d'émersion nul et un taux de recouvrement par l'herbier faible (7%). « En opposition », se situe le groupe 2 plus océanique (salinité moyenne 32,8 et sédiments sableux de médiane 190 µm), alors que les groupes 3 et 4 affichent des valeurs de paramètres environnementaux intermédiaires.

Figure 2 : Analyse en composante principale (ACP) basée sur 21 facteurs environnementaux (A) de 33 stations (B). Quatre groupes peuvent être distingués. La teneur de la matière organique dans le sédiment contribue à l'Axe 1 de l'ACP, alors que la salinité et la température contribuent à l'axe 2. Les étoiles représentent les stations du projet alors que les disques représentent les stations du réseau ARCHYD d'Ifremer ayant servi à obtenir des « vérités terrain » pour valider les calculs de température et de salinité par modélisation (voir texte). Le disque noir situe la station servant de référence pour la hauteur d'eau (marégraphe) afin de caler le paramètre «% temps d'émersion».

Tableau 1 : Différentes caractéristiques de l'environnement, moyennées pour chacun des groupes définies par l'ACP. Les valeurs de F (ANOVA) et H (Kruskal Wallis) ont été calculées en comparant les valeurs entre groupes. Les lettres en exposant rassemblent les groupes qui sont similaires pour un paramètre donné alors que les valeurs en gras se réfèrent aux groupes présentant des valeurs différentes des 3 autres (p<0.05).

		Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	F	H	*p*
Sédiment	Médiane (µm)	103 ^{b} ±52.8	**191.2** ^{a} ±85.3	96.5 ^{b} ±37.8	108.3 ^{b} ±22.5		13.23	***0.004***
	Pélites (%)	38.5 ^{a} ±11.3	**16.3** ^{b} ±16.3	38.8 ^{a} ±3.2	29.5 ^{a} ±8.3	8.32		***<0.001***
	Matière organique (%)	7.8 ^{bc} ±2.6	**3.2** ^{a} ±2.5	**9.1** ^{c} ±1.3	**6.2** ^{b} ±2.5	7.91		***0.000***
	Couverture herbier (%)	6.2 ^{a} ±10.8	72.2 ^{b} ±22.7	40.1 ^{ab} ±23.4	44.9 ^{ab} ±26.7	6.24		***0.002***
Salinité	Moyenne	**22.5** ^{c} ±3.7	**32.8** ^{b} ±0.3	30.3 ^{a} ±0.3	29.9 ^{a} 1.4		23.16	***<0.001***
	F <13‰	16.4 ^{a} ±8.7	0.0 ^{b} ±0	0.1 ^{ab} ±0.3	0.3 ^{ab} ±0.9		14.64	***0.002***
	F <28‰	**66.6** ^{a} ±19.0	1.8 ^{b} ±0.7	20.1 ^{b} ±3.9	22.7 ^{b} ±13.1		22.87	***<0.001***
	F <34‰	99.9 ^{a} ±0.0	**75.1** ^{b} ±7.8	99.8 ^{a} ±0.1	98.8 ^{a} ±1.5		21.92	***<0.001***
Température	Moyenne	16.7 ^{a} ±0.2	16.7 ^{a} ±0.1	17.0 ^{b} ±0.1	17.0 ^{b} ±0.1	31.80		***<0.001***
	Minimum	1.2 ^{bc} ±0.4	**3.1** ^{a} ±0.9	0.8 ^{c} ±0.5	1.9 ^{b} ±0.9	9.55		***<0.001***
	Maximum	34.4 ±0.5	33.1 ±2.2	34.1 ±2.1	32.2 ±2.6	1.36		0.274
	F < 8°C	9.5 ^{a} ±0.3	**4.2** ^{b} ±1.1	7.9 ^{a} ±0.2	7.5 ^{a} ±0.7		23.74	***<0.001***
	F <12°C	31.6 ^{a} ±0.7	**27.1** ^{b} ±0.2	28.0 ^{a} ±0.2	28.1 ^{a} ±0.5		23.11	***<0.001***
	F <16°C	50.4 ^{a} ±0.7	48.4 ^{ab} ±0.4	48.0 ^{b} ±0.2	48.3 ^{ab} ±0.3		12.13	***0.006***
	F < 20°C	62.7 ^{ac} ±1.3	63.1 ^{a} ±1.4	59.5 ^{b} ±0.3	59.9 ^{cb} ±0.7		23.07	***<0.001***
Courant F<0.25m/s		93.3 ±6.9	95.6 ±4.5	91.3 ±10.4	82.2 ±15.7		4.97	0.174
% temps émersion		0.0 ^{a} ±0	30.9 ^{b} ±16.9	32.9 ^{b} ±11.4	13.0 ^{a} ±15.1	6.26		***0.002***
Densité palourdes (ind/m²)		16.2 ^{ab} ±28.1	6.3 ^{a} ±7.9	51.4 ^{b} ±41.7	23.9 ^{ab} ±18.6		10.84	***0.012***
Distance (km)	Leyre	5.9 ^{ab} ±8.1	13.8 ^{a} ±1.1	12.4 ^{ab} ±1.3	8.2 ^{b} ±4.3		10.66	***0.013***
	Canal des étangs	9.8 ^{ab} ±8.1	8.2 ^{ab} ±0.9	3.3 ^{a} ±1.3	8.2 ^{b} ±4.1		9.07	***0.028***
	Océan Atlantique	12.7 ^{a} ±1.9	**3.0** ^{b} ±1.0	9.6 ^{a} ±0.4	9.5 ^{a} ±1.9		22.06	***<0.001***

Le groupe 1 réunit les palourdes les moins infestées par *Perkinsus* avec 7400 cellules.g^{-1} (branchie, PF), soit 8,6 fois moins que la moyenne pour le bassin d'Arcachon (62 000 cellules.g^{-1} (branchie, PF), avec un maximum à 2.10^{5} cellules.g^{-1})). La concentration en parasites est ensuite similaire entre les 3 autres groupes (70 000 cellules.g^{-1}). Ces résultats confirment le fait que la salinité est un facteur important pour expliquer le développement de la perkinsose (Leite et al. 2004). Pour l'espèce suspectée ici, probablement *Perkinsus olseni* (Arzul et al. 2012), les salinités optimales de développement se situent entre 25 et 35 (Auzoux-Bordenave et al. 1995), les fortes infections correspondant généralement à de fortes salinités (Burreson & Ragone Calvo 1996, Cigarría et al. 1997, Park & Choi 2001). Le bassin d'Arcachon étant finalement assez homogène sur sa surface en termes de salinité, la zone de faible salinité est restreinte au groupe 1 et doit représenter moins de 5% de la surface du bassin. Cela fait une « zone refuge » vis-à-vis de la perkinsose insignifiante en termes de surface et ne correspondant pas à des conditions environnementales favorables à la palourde.

La prévalence moyenne de la BMD dans le bassin pour les palourdes de la classe de taille considérée est de 11%, sans distinction significative entre groupes de station.

De par un gradient halin modeste, la distinction entre groupes de stations reste faible, que ce soit sur les critères environnementaux ou zooépidémiologiques. Cependant, certains facteurs de

l'environnementaux sont corrélés à l'émergence des maladies considérées (**Tableau 2**). La perkinsose se développe d'autant mieux dans des environnements riches en matière organique, montrant des fluctuations de température élevées et soumis à de plus longues émersions. La BMD est aussi corrélée au matériel sédimentaire fin (% de pélites, % de matière organique), l'intensité de la maladie étant en plus corrélée à la densité de palourdes.

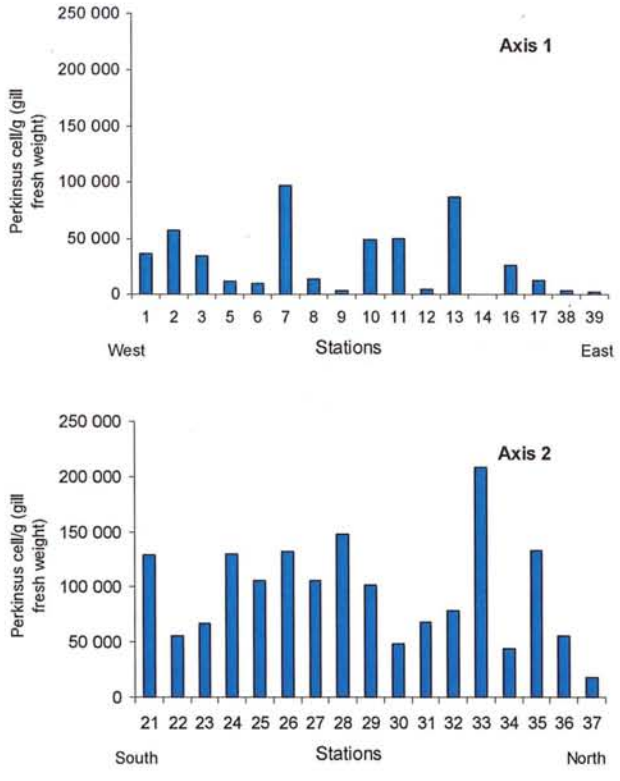
Tableau 2 : Corrélation entre d'une part la concentration en *Perkinsus*, la prévalence de la BMD et son intensité (Muscle Print Index) et différents paramètres de l'environnement (N=34). Les corrélations significatives sont en italique et en gras (p<0,05).

		***Perkinsus* concentration (Cells/g of gills)**		**BMD** Prevalence (%)		MPI	
		R	*p*	R	*p*	R	*p*
Sediment	Median (µm)	-0.04	0.829	-0.27	0.141	-0.28	0.119
	Silt (%)	0.25	0.149	***0.45***	***0.010***	***0.39***	***0.025***
	Organic matter (%)	***0.35***	***0.040***	***0.52***	***0.003***	***0.42***	***0.015***
	Seagrass cover (%)	0.09	0.594	0.07	0.713	-0.35	0.051
Salinity	Mean	0.29	0.101	-0.10	0.580	-0.26	0.145
	F <13‰	-0.31	0.073	0.08	0.672	-0.03	0.865
	F <28‰	-0.27	0.127	0.07	0.681	0.29	0.098
	F <34‰	0.03	0.875	***0.37***	***0.039***	***0.72***	***<0.001***
Temperature	Minimal	-0.29	0.093	***-0.37***	***0.034***	***-0.46***	***0.008***
	Maximal	0.29	0.090	0.12	0.514	-0.02	0.900
	Mean	0.09	0.614	0.12	0.6644	***0.66***	***<0.001***
	F < 8°C	0.00	0.990	0.32	0.071	***0.65***	***<0.001***
	F <12°C	-0.26	0.131	0.18	0.330	0.21	0.245
	F <16°C	***-0.35***	***0.043***	-0.00	0.987	-0.24	0.176
	F < 20°C	-0.17	0.344	-0.23	0.213	***-0.73***	***<0.001***
Current F<0.25m/s		0.09	0.626	-0.16	0.390	-0.20	0.270
% Emersion time		***0.34***	***0.048***	0.13	0.491	0.03	0.875
Clam density (ind/m²)		0.10	0.569	-0.12	0.502	***0.37***	***0.037***
Distance (km)	Leyre	***0.43***	***0.011***	0.28	0.114	-0.28	0.113
	Canal des étangs	***-0.51***	***0.002***	***-0.60***	***<0.001***	-0.20	0.260
	Atlantic ocean	-0.14	0.422	0.20	0.264	***0.62***	***<0.001***

Connaissant l'importance de la salinité, le résultat le plus étonnant issu du **Tableau 2** est que l'intensité de la perkinsose et la prévalence de la BMD augmentent en approchant de l'un des cours d'eau (Canal des Etangs) mais pas de l'autre (Leyre). Cette observation suggère que dans le bassin d'Arcachon le gradient environnemental n'est pas forcément à rechercher entre océan et cours d'eau mais plutôt entre un sous-bassin sud-est (appelé ici AXE 1) et un sous-bassin nord-ouest (appelé ici AXE 2). La comparaison entre ces 2 zones a permis non seulement de les distinguer en termes d'environnement (**Tableau 3**) mais également d'observer un développement des maladies très contrasté (**Figure 3**).

Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques de l'environnement selon les deux axes (Figure 2). Le test de Student (*t* value) a été réalisé pour comparer les valeurs entre les deux axes. Les différences significatives au seuil p<0,05 sont indiquées en italique et en gras.

		Axis 1	Axis 2	t	*p*
Sediment	Median (µm)	131.9	127.4	0.20	0.838
	Silt (%)	23.5	32.1	***-2.12***	***0.041***
	Organic matter (%)	4.3	7.3	***-3.11***	***0.004***
	Seagrass cover (%)	44.6	51	-0.60	0.550
Salinity	Mean	29.5	30.9	-1.38	0.178
	F <13‰	2.6	0.8	1.02	0.315
	F <28‰	25.2	15.2	1.49	0.144
	F <34‰	91.2	92.3	-0.27	0.790
Temperature	Mean	16.9	16.9	0.30	0.765
	Minimal	2.5	1.7	***2.28***	***0.029***
	Maximal	32.1	33.7	***-2.05***	***0.048***
	F < 8°C	6.6	6.9	-0.39	0.700
	F <12°C	28.2	27.9	0.69	0.489
	F <16°C	48.6	48.3	1.33	0.191
	F< 20°C	61.3	60.9	0.57	0.573
Current F<0.25m/s		85.3	91.9	-1.53	0.135
% Emersion time		11.4	28.3	***-3.16***	***0.003***
Clam density (ind/m²)		17.6	27.7	-1.11	0.273
Distance (km)	Leyre	7.2	13.3	***-5.10***	***<0.001***
	Canal des étangs	10.9	4.5	***7.83***	***<0.001***
	Atlantic ocean	8.4	7.4	0.83	0.414



En effet, l'AXE 2 regroupe les stations avec un taux de pélites et de matière organique environ 1,5 fois plus élevé, des températures extrêmes plus prononcées et concerne des stations qui sont dans le temps 2,5 fois plus émergées. Dans cet environnement, l'abondance en *Perkinsus* est 3 fois plus intense que le long de l'AXE 1 (95 701 cellules.g^{-1} contre 28 917 cellules.g^{-1}), et la prévalence de la BMD est 2,6 fois plus forte (16,1% contre 4,5%).

Figure 3 : Abondance en *Perkinsus* (cellules.g^{-1}) par station et par axe : Axe 1 = secteur sud-ouest ; Axe 2 = secteur nord-est (ces axes n'ont aucun rapport avec l'ACP).

La différence entre les 2 axes s'explique par les caractéristiques hydromorphologiques du bassin d'Arcachon : à chaque marée, 1/3 de la masse d'eau transite par l'AXE 2 contre 2/3 par l'AXE 1 (SOGREAH 2001). Ainsi l'AXE 2 se situe dans un contexte de plus faible turn-over de la masse

d'eau avec moins de courant, plus de sédimentation des particules fines, plus de températures extrêmes, des vasières plus hautes, etc. Concernant la perkinsose, une relation positive avec la présence de vase a déjà été observée (Choi et al. 2002).
En revanche, concernant la BMD, aucune autre étude ne permet de comparer ces résultats.

2.1.3 Conclusion

L'ensemble de la partie lagunaire du bassin d'Arcachon (155 km²) abrite des palourdes dont l'état de santé n'est pas bon. Les deux maladies, la perkinsose et la BMD, sont présentes sur l'ensemble de la zone, mais affichent des prévalences plus élevées dans le secteur nord-est qui correspond à un environnement avec un turn-over de masse d'eau plus faible et donc, causes et/ou conséquences, des courants plus faibles, des sédiments plus fins, des paramètres températures/salinités à extrêmes plus prononcées et des vasières plus émergées. Les zones refuges correspondent à des stations de très faible salinité qui, dans cette lagune, occupent une surface négligeable (autour de 5% de la surface totale) et de plus doivent être peu favorables au bon développement des palourdes.
Cette étude a également permis de sélectionner les stations qui seraient suivies par les différents partenaires, en prenant en compte : la variété des situations environnementales, la proximité de stations suivies dans le cadre de réseaux, l'accessibilité et la présence en nombre suffisant de palourdes (**Figure 4**)

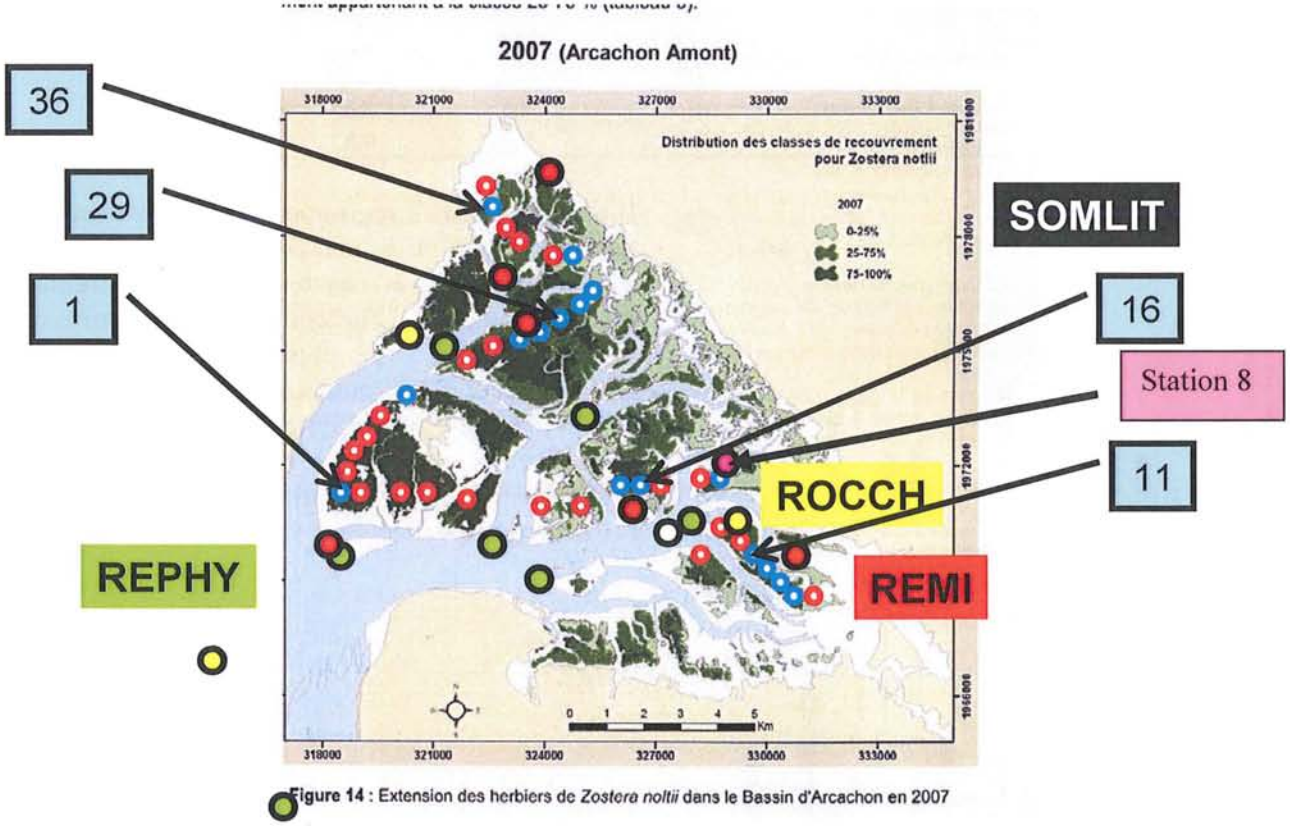


Figure 14 : Extension des herbiers de *Zostera noltii* dans le Bassin d'Arcachon en 2007

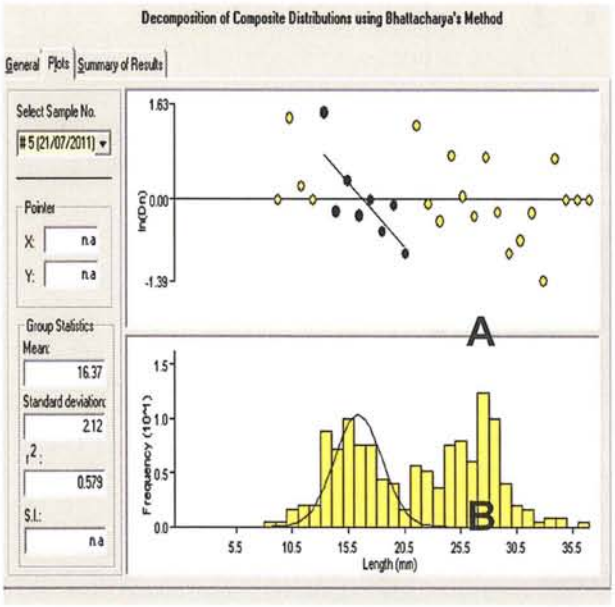
Figure 4 : Ensemble des stations échantillonnées (cercle bleu ou rouge à centre blanc) ainsi que localisation des stations faisant l'objet d'un suivi institutionnel (REMI, REPHY, ROCCH, SOMLIT). Les stations 1, 8, 11 (= B), 16, 29 et 36 ont été sélectionnées dans ce projet sur des critères de présence/abondance de palourdes, d'accessibilité, de proximité d'une station faisant l'objet d'un suivi à long terme, d'une représentativité supposée d'une aire intrabassin. La station d'Arguin (Station A) est située hors champs (point vert au sud-ouest).

2.2 *Interactions* Perkinsus/BMD/palourdes

Objectifs : Déterminer le seuil des tailles/âges des palourdes pour première infestation ; i) qualifier la dynamique « pathogène (ou pathologie)/Palourde » (i.e. stable, saisonnière, irrégulière…) ii) Evaluer les effets des maladies (Perkinsose, BMD) sur le taux de croissance, l'indice de condition et les paramètres immunitaires des palourdes, iii) Evaluer les interactions entre Perkinsose *et* BMD.

2.2.1 Dynamique *Perkinsus*/palourde

2.2.1.1 Méthodologie



Un échantillonnage aléatoire a été effectué chaque mois, d'avril 2011 à mai 2012, sur la station 8 (**Figure 5**). Dix quadrats de 50 cm x 50 cm sur 10 cm d'épaisseur de sédiment ont été prélevés chaque mois. Le sédiment a été tamisé à l'aide d'un tamis de maille 10 mm pour récupérer les palourdes. Les palourdes échantillonnées ont été mesurées au mm inférieur (longueur de la coquille) afin d'effectuer les histogrammes de taille et ainsi distinguer les différentes cohortes. Cette analyse de cohortes a été réalisée grâce au logiciel Fisat II en utilisant la méthode de Bhattacharya. Cette dernière permet d'identifier des composantes modales qui peuvent être reconnues comme étant des cohortes (**Figure 5**).

Figure 5 : Exemple d'utilisation du logiciel FISAT II pour le mois de juillet 2011. (A) Segment de droite correspondant à la cohorte recrutée en 2010 et observée sur l'histogramme en (B)

Le dénombrement de *Perkinsus* dans les branchies de palourde a été effectué en utilisant la méthode d'analyse de Ray en milieu fluide thioglycollate (RFTM). Pour la cohorte recrutée en 2009, 32 individus ont été traités tous les 3 mois (juin 2011, septembre 2011, décembre 2011 et mars 2012) tandis que pour la cohorte recrutée en 2010, 32 individus l'étaient chaque mois (juin 2011 jusqu'à mai 2012). La transmission du parasite se faisant d'hôtes à hôtes, le suivi de la cohorte 2009 a été réalisé afin d'avoir une image du contexte parasitaire du site et ainsi faciliter l'interprétation des résultats obtenus pour la cohorte 2010. La croissance des palourdes étant plus faible au stade adulte, l'échantillonnage de cette cohorte 2009 a été réalisé tous les 3 mois.

2.2.1.2 Résultats et Discussion

Du fait d'une maille de tamisage de 10 mm, les premières palourdes de la cohorte 2010 ont été échantillonnées en juin 2011 et mesuraient déjà 12 mm (longueur moyenne). Ces individus avaient sans doute ≈ 9 mois d'âge. Néanmoins, dès cet âge (et/ou longueur), les individus étaient déjà parasités avec une prévalence de 53 % et une abondance parasitaire (médiane) de 490 cellules/gPF branchie.

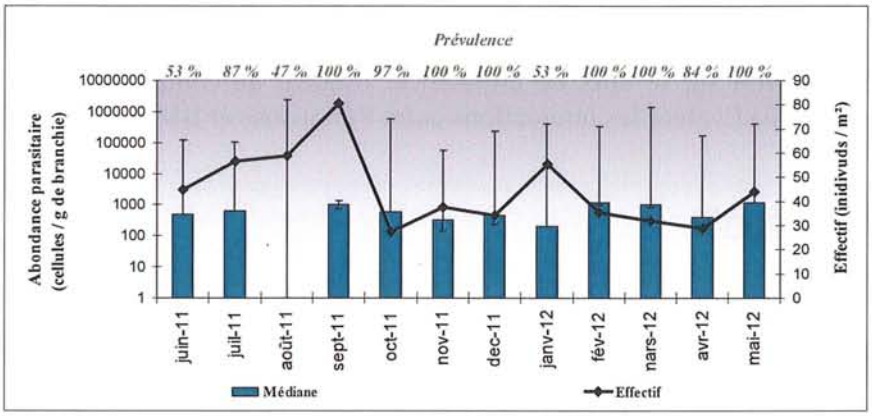


Figure 6 : Médianes (barre = maximum) des abondances parasitaires (échelle logarithmique, axe de gauche), prévalences de *Perkinsus* (en haut du graphe) et des effectifs (axe de droite) de la cohorte 2010 de palourdes.

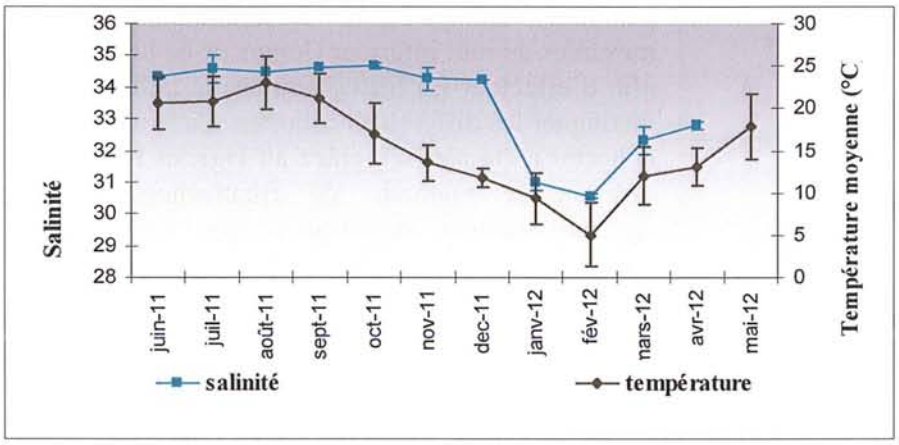


Figure 7 : Température du sédiment et salinité moyennes (± écart-type) de la Station 8.

Le niveau d'infestation est de l'ordre de 10^3 cellules/gPF branchie, ce qui reste au-dessous du seuil supposé de pathogénicité ($\approx 10^6$). Expérimentalement, des mortalités de palourdes de cette gamme de taille ont été observées pour des intensités parasitaires $>10^6$ cellules/gPF branchie (Waki et al. 2012). Il n'apparaît pas de dynamique temporelle claire si ce n'est une légère augmentation de l'infestation ($p<0,05$) entre janvier et février 2012 (**Figure 6**). Par ailleurs, la cohorte plus âgée (recrutée en 2009) présente des niveaux d'infestation similaires ($\approx 10^3$ cellules/gPF branchie) traduisant donc une absence de cumul de parasites dans le temps et avec l'âge. Ces résultats confirment une particularité de fonctionnement du bassin d'Arcachon suggérant que l'infestation par *Perkinsus* se fait par pulse (Dang et al. 2010a), peut-être à l'occasion d'événements de mortalité puisque le parasite est supposé être transmis d'un individu à l'autre lors de la mort et de la putréfaction des palourdes hôtes. Le suivi de l'abondance totale de palourdes affiche effectivement une baisse d'effectif entre janvier 2012 (232 ind/m²) et février 2012 (130 ind/m²) pouvant traduire une telle mortalité, coïncidant avec des minima de température et de salinité (5,0°C et 30,6, respectivement) (**Figure 7**). Si cette salinité relativement basse par rapport au reste de l'année (34) se situe quand même dans l'intervalle optimal de *Perkinsus olseni* (Auzoux-Bordenave et al. 1995), les plus fortes infestations sont généralement corrélées aux plus fortes salinités (Cigarría et al. 1997, Park & Choi 2001).

Ce manque de saisonnalité et cette dynamique en pulse n'est pas une généralité puisque des études sur d'autres sites mentionnent des dynamiques d'infestation par *Perkinsus* plus « classiques » avec des pics correspondant à des températures relativement élevées (Villalba et al. 2005, Yang et al. 2012).

2.2.1.3 Conclusion

Si des travaux antérieurs avaient déjà mis en évidence les fortes prévalences et abondances parasitaires en *Perkinsus* dans le bassin d'Arcachon, avec des valeurs moyennes de 10^4 cellules/gPF branchie chez les palourdes adultes (Dang et al. 2010a) qui ne doivent pas masquer des « spots » où les 10^5 cellules/gPF branchie sont dépassées, la présente étude a montré que les palourdes étaient infectées très jeunes et donne de nouveaux arguments pour confirmer que dans cette lagune l'infection se fait par épisodes et selon un rythme qui ne semble pas directement lié aux saisons. Dang et al. (2010a) avaient ainsi suggéré qu'une année pouvait passer sans infestation des palourdes.
La question de la pathogénicité de *Perkinsus* reste entière mais est certainement corrélée à la concentration en cellules dans les tissus hôtes. Dans le cadre de REPAMEP, nous avons évalué l'effet de *Perkinsus* comme co-facteur de stress sur les palourdes (voir partie microalgues/métaux § 4.2) mais nous avons également traité des données antérieures pour tenter d'évaluer l'effet de la concentration en *Perkinsus* sur un paramètre lié à la santé du bivalve, sa croissance.

2.2.2 Impact de Perkinsus sur la croissance des palourdes

2.2.2.1 Méthodologie

Dans le cadre d'un projet précédent sur le bassin d'Arcachon, des palourdes japonaises ont été marquées individuellement et mises dans des enclos (4 situations géographiques) pendant 21 mois afin de modéliser leur croissance (Dang et al. 2010b). Ces données ont été reprises en tentant de corréler le taux de croissance en longueur de coquille des palourdes à la concentration en cellules de *Perkinsus* mais également à un indice lié à l'état de santé, l'indice de condition. En effet, des phénomènes comme les pathologies, la température de l'eau ou encore l'abondance de nutriments dans le milieu peuvent engendrer des variations de la quantité de chair. Cette quantité correspond à la « condition » de l'animal. Dans le cas de cette étude, un indice possédant une forte sensibilité (Bodoy et al. 1986) a été choisi : (Poids sec chair (en mg) / Poids sec coquille (en g))
Une régression multiple de type (Taux de croissance)=f(*Perkinsus*, indice de condition) a été réalisée.

2.2.2.2 Résultats et Discussion

Entre les 4 situations géographiques testées, l'intensité moyenne d'infestation est assez homogène, comprise entre 10^4 et 10^5 cellules/gPF branchie, et supposée stable dans le temps d'après une expérience précédente (Dang et al. 2010a). Les taux de croissance et les indices de conditions vont en revanche du simple au double (**Tableau 4**).

Tableau 4: Intensité moyenne de *Perkinsus* (échelle logarithmique) taux de croissance en longueur des coquilles (TC en µm/j) et indice de condition (IC) des palourdes japonaises au banc d'Arguin et à l'Ile aux Oiseaux (bassin d'Arcachon). LTL, MTL et HTL, correspondent à des bas, moyen et haut niveaux de marée.

	Arg LTL	Arg MTL	Arg HTL	Ile aux Oiseaux
intensité *Perkinsus*	4.4	4.5	4.5	4.4
TC	15.8	20.9	13.0	20.6
IC	49.9	62.7	78.6	44.5

Les régressions multiples donnent des résultats différents selon les sites : dans 2 sites/4, la concentration en *Perkinsus* est liée négativement au taux de croissance mais n'explique que 7 à 19% de la variabilité (**Tableau 5**). Ces 2 sites (Arg LTL et Ile aux Oiseaux) correspondent aux palourdes aux indices de conditions les plus bas (<50‰). Sur un site (Arguin HTL), le seuil de significativité est p=0,08, et sur un autre, il n'y a pas d'effet significatif (p=0,27). A notre connaissance, aucune autre étude ne s'est attachée à corréler la présence de *Perkinsus* au taux de croissance des palourdes.

Chez l'huître *Crassostrea virginica* parasité par *P. marinus,* un effet négatif a été observé en Louisiane (Menzel & Hopkins 1955).
Une corrélation entre *Perkinsus* et indice de condition n'a pas été possible à cette époque, car les indices n'étaient mesurés qu'en fin d'expérience (sacrifice des organismes) et donc peu représentatifs de l'interaction hôte/parasite sur le long terme.

Tableau 5: Paramètres de l'Anova de la régression multiple exprimant la variable dépendante (taux de croissance) en fonction des variables indépendantes (indice de condition (CI) et intensité en *Perkinsus*) (A) et table des coefficients (B).

A.

	Arguin LTL	*Arguin MTL*	*Arguin HTL*	*Ile aux Oiseaux*
n	*63*	*117*	*129*	*172*
R^2	*0,26*	*0,02*	*0,17*	*0,07*
F	*10,60*	*1,17*	*13,03*	*6,61*
p	*< 0,001*	*0,31*	*< 0,001*	*< 0,001*

B.

Site	Predictor variable	B	Standard error of B	P level
Arguin LTL	*a*	*27,30*	*6,57*	*< 0,001*
	CI	0,15	0,12	0,21
	Perkinsus	-4,47	0,98	< 0,001
Arguin MTL	a	-1,35	19,2	0,94
	CI	0,48	0,34	0,16
	Perkinsus	-2,20	1,98	0,27
Arguin HTL	*a*	*-15,44*	*7,18*	*0,03*
	CI	*0,42*	*0,09*	*< 0,001*
	Perkinsus	-1,04	0,60	0,08
Ile aux Oiseaux	a	12,47	10,04	0,22
	CI	*0,42*	*0,18*	*0,02*
	Perkinsus	*-2,53*	*1,01*	*0,01*

2.2.2.3 Conclusion

Parmi les facteurs qui peuvent expliquer le défaut de croissance des palourdes dans le bassin d'Arcachon (Dang et al. 2010b), le parasitisme par *Perkinsus olseni* peut donc être évoqué même si « sa part de responsabilité » semble mineure. Les expériences ont cependant été menées pour des intensités de l'ordre de 3.10^4 cellules/gPF branchie, alors que 1) dans le bassin ces valeurs peuvent facilement dépasser les 10^6 et 2) que cette valeur de 10^6 apparaît aussi comme un seuil quant à l'état de santé des palourdes (§ 2.2.4 et Villalba et al. 2004).

2.2.3 Dynamique BMD/palourde

2.2.3.1 Méthodologie

En parallèle au suivi de la perkinsose, la prévalence de la BMD a été suivie par cohorte, sur l'ensemble des palourdes prélevées (soit entre 193 et 581 par mois). La stratégie d'échantillonnage a été décrite ainsi que le diagnostic de la BMD (§ 2.2.1).

2.2.3.2 Résultats et Discussion

La BMD est apparue au mois de septembre pour la cohorte 2009 (**Figure 8**), soit pour des individus de 27 mm et de ≈ 2 ans. Ce résultat coïncide avec les observations de Dang et de Montaudouin (2009) (Lmin=25 mm). L'absence de l'apparition de la BMD avant cette taille de 27 mm est à nuancer car 1) il existe peut-être un temps de latence entre l'infestation par l'agent et l'apparition des 1ers signes

macroscopiques et/ou 2) la fragilité des jeunes palourdes entraîne la mort rapide avant même l'apparition des 1ers symptômes.
La prévalence varie suivant les mois : à chaque fois que la prévalence augmente, elle diminue de manière significative le mois suivant. Concernant les individus dont la taille est supérieure à 32 mm et dont l'âge ne peu être déduit (**Figure 9**), le même schéma d'une augmentation suivie d'une diminution significative semble se reproduire. La BMD entraînant inévitablement la mort des individus, ces diminutions de prévalences pourraient être expliquées par des mortalités des individus atteints. Dans ce cas, la maladie se développe très vite en provoquant la mort des individus un mois ou deux après avoir détecté les 1ers signes de la maladie. Contrairement aux observations de Dang et de Montaudouin (2009) qui suggéraient que la BMD se déclarait quand la T°>13°C, le printemps et l'été, avec un pic en juillet, ces résultats ne font pas apparaître de saisonnalité claire.

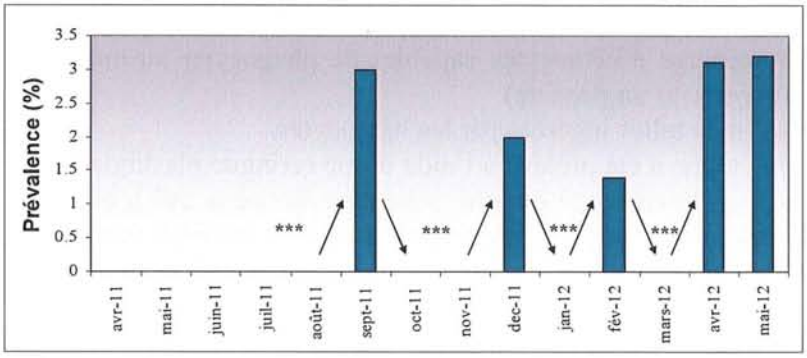


Figure 8 : Prévalences de la BMD pour des individus de la cohorte recrutée en 2009 (* : p < 0,001)**

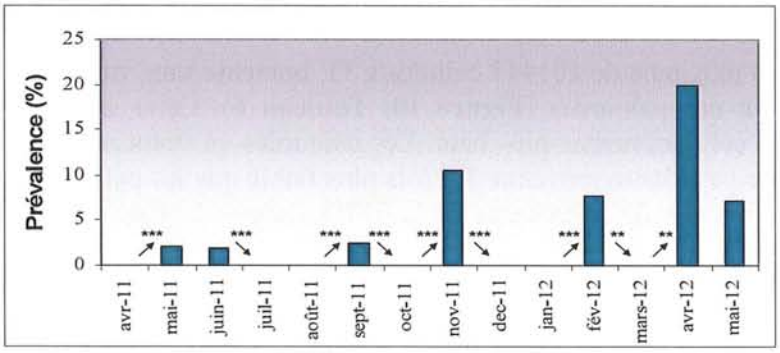


Figure 9: Prévalences de la BMD pour des individus de taille > 32 mm (: p < 0,01 et *** : p < 0,001)**

2.2.3.3 Conclusion

Même si une taille seuil de palourde a été confirmée pour l'infestation par la BMD, une analyse de données fine de dynamique du système « pathologie/hôtes » est limitée par la difficulté d'identifier des cohortes après l'âge de 2 ans et par les prévalences de BMD relativement faibles pour ce type d'étude. La détection PCR de l'éventuel agent infectieux de la BMD, objectif non encore atteint dans ce projet (§ 2.3), permettrait sans doute de faire de larges progrès dans cet axe de recherche.

2.2.4 Effet de la BMD sur la santé des palourdes

2.2.4.1 Méthodologie

Afin d'étudier la relation entre {BMD} d'une part et {perkinsose, indice de condition et paramètres immunitaires} d'autre part, soixante palourdes vivant selon 3 statuts différents ont été saisonnièrement prélevées à la main les 6 février 2012 (hiver), 2 mai (printemps), 22 août (été) et 13 novembre (automne) :
- 20 palourdes vivant en profondeur = position normale

- 20 palourdes vivant en surface = position anormale, et non atteintes par la BMD (dites saines)
- 20 palourdes vivant en surface = position anormale, et atteintes par la BMD (dites malades).

Remarque : les palourdes enfouies avec BMD sont trop rares pour considérer ce statut.

- Les palourdes avaient des tailles semblables entre statuts mais légèrement différentes entre saisons.
- Le dénombrement en *Perkinsus* dans les branchies de palourdes a été effectué.
- L'indice de condition (IC) a été mesuré afin d'évaluer l'état physiologique de l'individu en fonction des conditions du milieu.
- Les paramètres hémocytaires ont été mesurés dans l'hémolymphe des palourdes des 3 lots en cytométrie en flux. Trois paramètres ont été suivis :

- le THC, pour Total Hemocyte Count : concentration en hémocytes circulants dans l'hémolymphe.
- le pourcentage de phagocytose : le pourcentage d'hémocytes capables de phagocyter au moins 3 billes fluorescentes (les billes de Ø = 2 µm miment un parasite)
- la capacité de phagocytose : nombre moyen de billes ingérées par les hémocytes.

Pour chaque individu, 0,5 à 1 mL d'hémolymphe a été prélevé à l'aide d'une seringue plastique avec aiguille stérile. Les prélèvements observés au microscope optique pour éliminer ceux qui n'ont pas été conformes (présence de cristaux de sels et/ou autres contaminants indiquant le prélèvement de fluides palléaux). Chaque prélèvement a ensuite été filtré sur une maille de 80 µm, puis conservée dans la glace afin d'éviter l'agrégation des hémocytes.
Les analyses ont été réalisées par le LEMAR (Université de Bretagne Occidentale - Plouzané) sur le cytomètre en flux FACSCalibur puis traitées à l'aide du logiciel WinMDI 2.9.

2.2.4.2 Résultats et Discussion

L'abondance parasitaire (*Perkinsus*) est en moyenne de 101443 cellules/g PF branchie sans variation saisonnière, et cela quel que soit le statut des palourdes (**Figure 10, Tableau 6**). Cette stabilité saisonnière semble donc la règle et a déjà été commentée plus haut. Les palourdes en statut optimal (enfouies et sans BMD) ont une abondance parasitaire moyenne 3,6 fois plus faible que les palourdes de surface chez qui aucune différence en fonction de la présence de la BMD n'apparaît (**Figure 10**). *Perkinsus* apparaît donc comme l'un des principaux moteurs de la remontée des palourdes, et il semble que la BMD exacerbe ce mouvement l'automne.

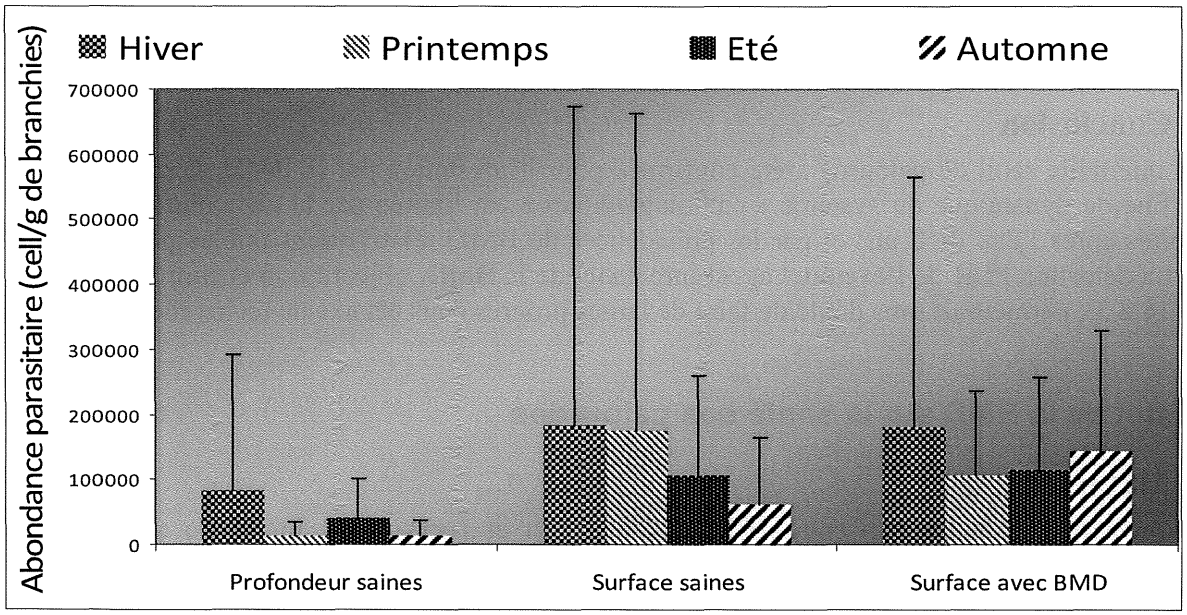


Figure 10 : Abondance parasitaire (+1 écart-type) en cellules *Perkinsus*/g poids frais de branchie, selon les saisons et selon le statut des palourdes : enfouies sans BMD, en surface sans BMD et en surface avec BMD.

Tableau 6 : Résultats des Anova concernant la comparaison d'un certain nombre de paramètre des palourdes en fonction de leur statut (voir texte) et des saisons.

Variable	Traitement	ANOVA factorielle			Tests Post-hoc
		ddl	F	p	
Longueur (mm)	Saison	3	13,04	p < 0,0001***	Printemps/Eté < Eté/Hiver < Hiver/Automne
	Statut	2	0,51	p =0,602	
	Saison x statut	6	0,47	p = 0,826	
Abondance *Perkinsus* (cell de perk/g de branchies → Log (X+1))	Saison	3	1,14	p = 0,33	
	Statut	2	9,17	p < 0,001**	Profondeur saines < Surface saines/Malades
	Saison x statut	6	0,81	p = 0,56	
Indice de condition (‰)	Saison	3	24,23	p < 0,0001***	Hiver < Automne < Printemps/Eté
	Statut	2	127,41	p < 0,0001***	Malades < Surface saines < Profondeur saines
	Saison x statut	6	4,31	p < 0,001**	*voir figure 11*
Total Hemocytes Count (cell/mL)	Saison	3	19,85	p < 0,0001***	Hiver < Eté/Automne < Automne/Printemps
	Statut	2	2,15	p = 0,1187	
	Saison x statut	6	5,75	p < 0,001**	
% de phagocytose (3 billes et +)	Saison	3	90,32	p < 0,0001***	Été < Hiver < Printemps/Automne
	Statut	2	10,98	p < 0,0001***	Surface saines / Profondeur saines < Malades
	Saison x statut	6	13,21	p < 0,0001***	*voir figure 14*
Capacité de phagocytose (nb de billes / cell actives)	Saison	3	83,64	p < 0,0001***	Printemps/Hiver < Eté < Automne
	Statut	2	26,45	p < 0,0001***	Profondeur saines < Surface saines/Malades
	Saison x statut	6	20,53	p < 0,0001***	*voir figure 13*

En parallèle, l'indice de condition fluctue saisonnièrement avec des maxima logiques au printemps/été liés à la période de reproduction (**Figure 11**). Même chez les palourdes enfouies sans BMD, l'indice de condition reste faible, autour de 40, comme déjà observé dans le bassin d'Arcachon (Dang et al. 2010b, de Montaudouin et al. 2010), et donc bien inférieur au valeurs mesurées ailleurs (Laruelle et al. 1994, de Montaudouin et al. 2010). Par ailleurs, lors de notre suivi, l'indice de condition marque un réel déficit (-32%) chez les palourdes de surface sans BMD (27) et surtout avec BMD (22), ces dernières ne marquant plus de réelle saisonnalité. Une précédente étude avait montré également une chute de l'IC de l'ordre de 20%, particulièrement chez les palourdes dont le muscle était atteint à plus de 50% (stades MPI 3 et 4) (Dang & de Montaudouin 2009).
Ces résultats sont cohérents avec ceux concernant la perkinsose, l'effet de la BMD étant cependant plus évident sur l'atteinte de l'indice de condition que sur la remontée des palourdes possiblement due à une perkinsose élevée.

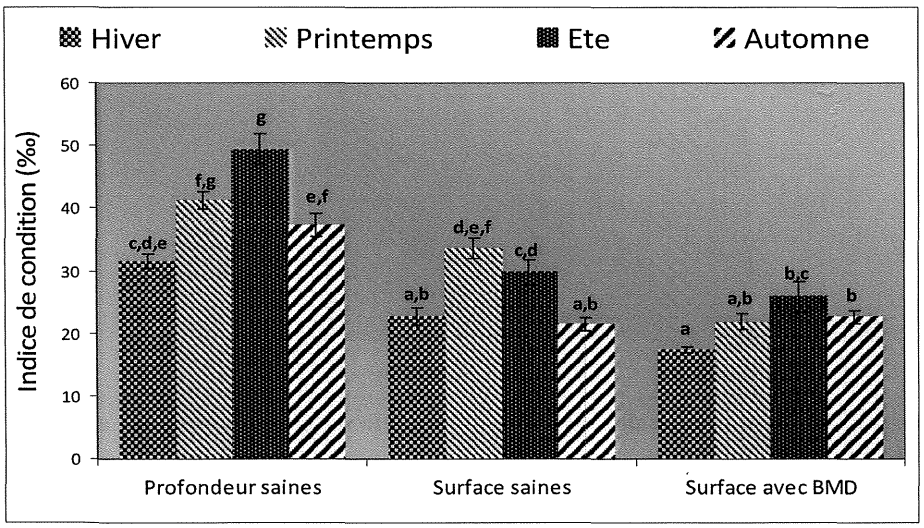


Figure 11 : Indice de condition des palourdes (‰), selon les saisons et selon le statut des palourdes : enfouies sans BMD, en surface sans BMD et en surface avec BMD. Les lettres différentes distinguent des valeurs différentes au seuil de 5%.

La « réponse » immunitaire, ou du moins l'état des paramètres immunitaires en fonction du statut des palourdes, est une première concernant la BMD. Le paramètre le plus classiquement mesuré, le THC (Total Hemocyte count) montre des variations saisonnières connues (Soudant et al. 2004) sans effet du statut BMD des palourdes mais cependant avec une forte interaction des 2 facteurs ($p<0,001$) (**Figure 12, Tableau 6**). Ces interactions ne dégagent pas de scénario clair.

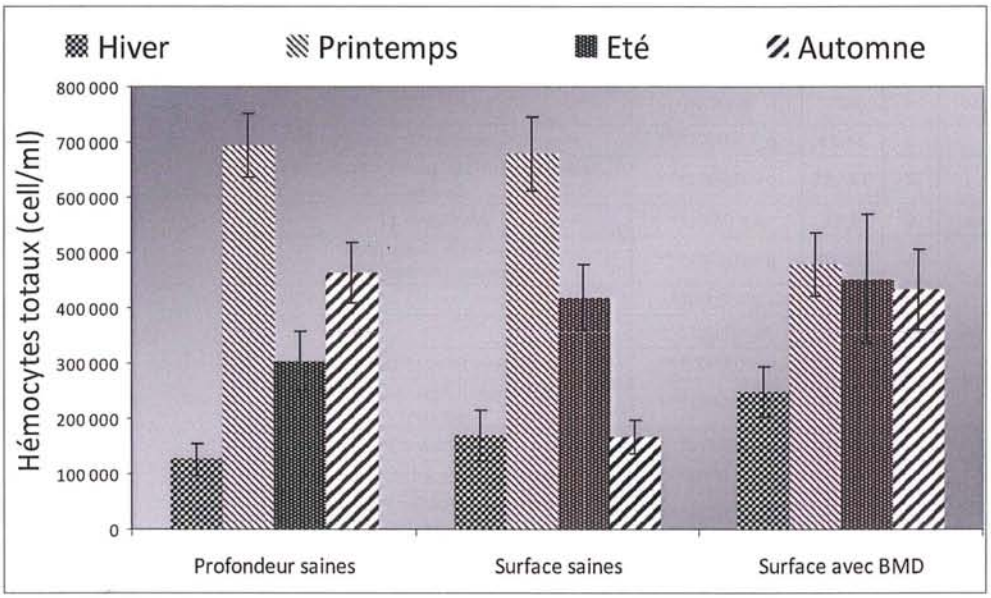


Figure 12 : Concentration en hémocytes (cellules. mL^{-1}), selon les saisons et selon le statut des palourdes : enfouies sans BMD, en surface sans BMD et en surface avec BMD.

En revanche, l'efficacité des hémocytes traduite ici par les performances de phagocytose révèle des différences entre statut des palourdes (et également entre saisons). La capacité de phagocytose est plus intense chez des palourdes en surface (malades de la BMD ou non) (**Figure 13**), sauf en hiver quand le nombre total d'hémocytes est au plus bas. Quant au pourcentage de phacocytose, il est le plus élevé chez les palourdes de surface atteintes de la BMD (**Figure 14**).

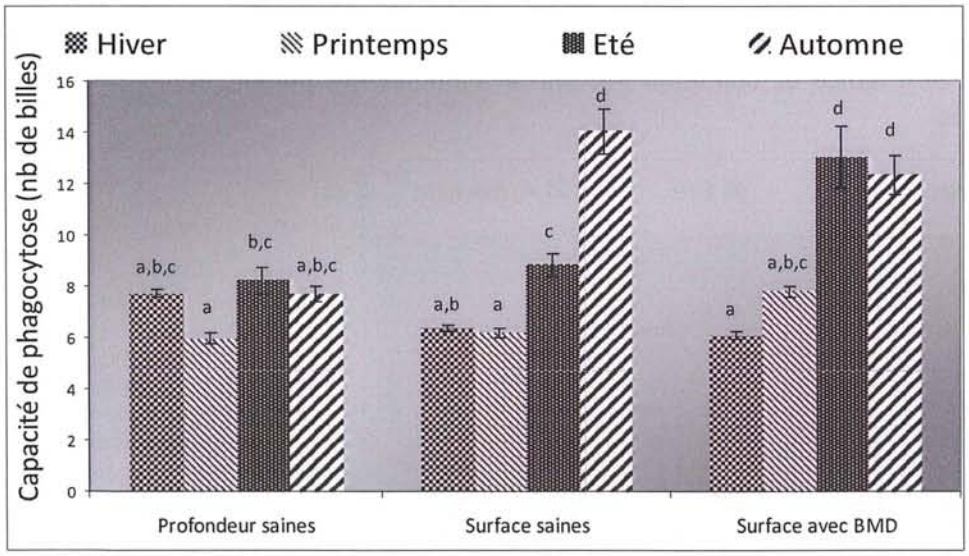


Figure 13 : Capacité de phagocytose (nombre de billes), selon les saisons et selon le statut des palourdes : enfouies sans BMD, en surface sans BMD et en surface avec BMD.

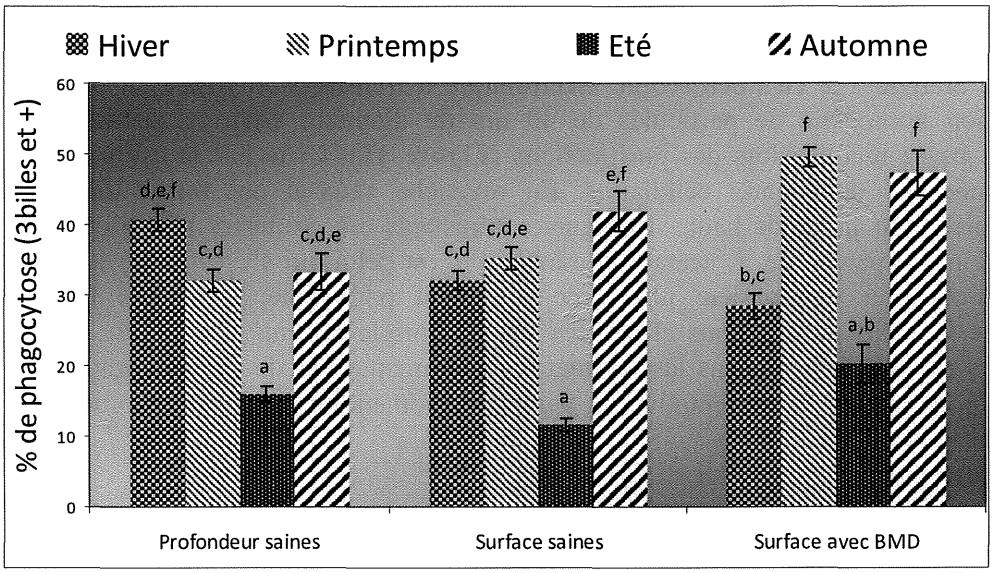


Figure 14 : Pourcentage de phagocytose (3 billes et +), selon les saisons et selon le statut des palourdes : enfouies sans BMD, en surface sans BMD et en surface avec BMD.

2.2.4.3 Conclusion

Il est délicat (voire impossible) de découpler les effets de la perkinsose de ceux de la BMD. Il apparaît cependant qu'une augmentation de l'abondance de *Perkinsus* (seuil vers 10^5 cellules/gPF chair) suffise à faire remonter les palourdes à la surface dans une situation à la fois anormale et dangereuse (dessiccation, prédation). Au sein de ces palourdes de surface, celles qui sont en plus atteinte de la BMD sont caractérisées par un indice de condition particulièrement faible traduisant un état de santé mauvais. En réponse à la BMD, les palourdes ont une activité de phagocytose plus élevée, mais basée sur un nombre d'hémocytes égal pour l'ensemble des palourdes des différents statuts.

2.3 Recherche de l'agent infectieux de la BMD

Objectifs : Purification des particules – Tentatives de caractérisation moléculaire – Tentatives de cultures cellulaires

2.3.1 Purification de l'agent étiologique

L'une des étapes essentielle à la caractérisation d'un agent infectieux est sa purification afin de pouvoir envisager par la suite une identification moléculaire ou réaliser, en condition contrôlée de laboratoire, des tentatives d'infestation d'organismes afin de reproduire la maladie identifiée sur le terrain. Dans ce but, une collaboration a été établie avec le laboratoire de virologie de l'INRA de Jouy en Josas. Au cours de notre étude et en fonction des analyses moléculaires réalisées, deux approches ont été mises au point pour la purification de l'agent étiologique de la BMD.

2.3.1.1 Purification sur gradient de sucrose

L'agent pathogène a été purifié sur gradient de sucrose. Celui-ci est constitué de solutions de saccharose à 60, 50, 40, 30 et 20 %. Plusieurs purifications ont été effectuées sur trois types d'échantillons broyés dans du milieu de Eagle modifié (dilution 1/5) à l'aide de sable de Fontainebleau stérile : muscle sain (S), jaune (J) et marron (M). Des bandes floculées ont été retrouvées dans les gradients de tous les échantillons S, J, M, mais une bande haute et une bande basse caractéristiques du tissu marron ont été récoltées. Ces deux fractions ont été analysées par

visualisation en microscopie électronique à transmission afin de mieux discerner quelle bande correspondait à l'agent pathogène purifié.
L'utilisation d'acétate d'uranyle 1% en microscopie électronique à transmission (MET) a permis d'observer une population homogène de particules de 40 nm de diamètre environ, denses aux électrons, pour la bande basse récoltée lors des purifications (**Figure 15**). Cette bande est apparue propre et peu contaminée par des débris cellulaires. En revanche ceux-ci ont rendu difficile l'observation des particules pour la bande haute. Plusieurs contrastants ont été testés afin d'obtenir une meilleure visualisation des particules. L'acétate d'uranyle 1% est celui qui s'est montré le plus efficace et a permis d'observer de manière plus précise l'agent pathogène. La bande basse, spécifiquement retrouvée lors des purifications effectuées sur du muscle marron, a donc été jugée suffisamment propre et a pu être utilisée dans les premières expérimentations de culture cellulaire, d'obtention d'anticorps polyclonaux et de tentative de caractérisation moléculaire du génome que nous avons effectuées par la suite.

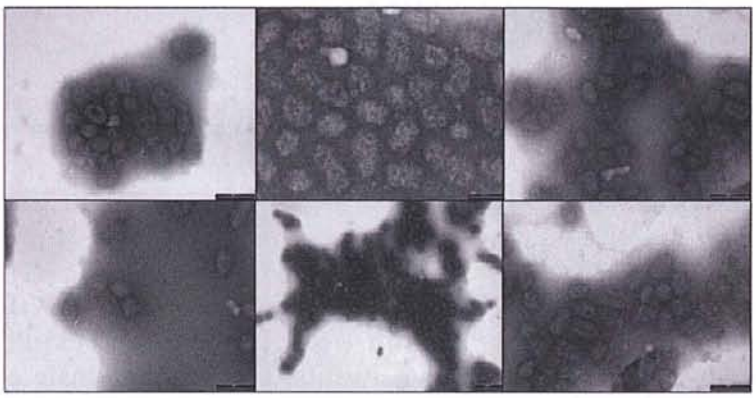


Figure 15 : Caractérisation des particules virale par microscopie électronique à transmission (contrastant acétate d'uranyle 1%, pH 6,5) sur la bande basse de la purification du muscle marron.

2.3.1.2 Purification sur coussin de sucrose et gradient de sucrose

Les premières analyses moléculaires ont montré que nos purifications comportaient des débris de tissus provenant de la palourde. Afin d'éliminer la majorité de ces fragments de tissu, le protocole de purification a été amélioré. Ainsi, avant d'être déposés sur le gradient de sucrose, les échantillons (7-8mL) sont déposés sur 2,5mL de coussin de sucrose à 30%. Cette étape permet de récupérer un culot de particules, resuspendu dans 500µl de TEN 1X. La fraction de débris cellulaires provenant de l'hôte est parfaitement visible sur le gradient (**Figure 16**). L'échantillon est alors déposé sur gradient de sucrose et analysé en MET comme présenté précédemment.
Les photos réalisées en microscopie électronique mettent en évidence des préparations quasi-exemptes de débris et très concentrées en particules virales (**Figure 16**).

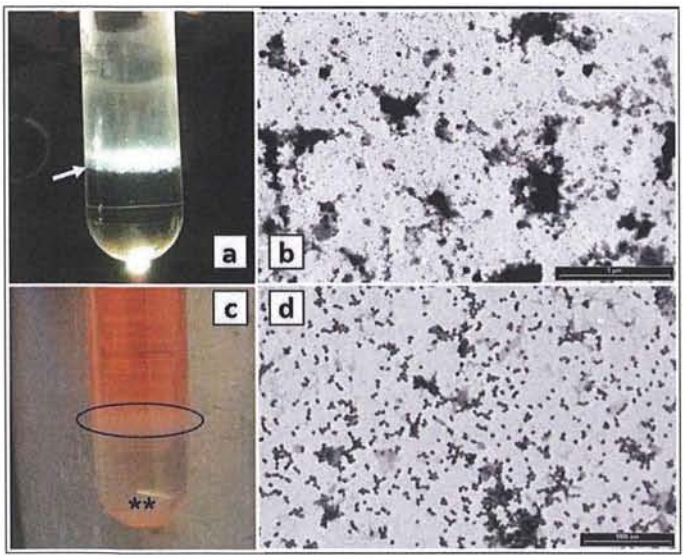


Figure 16 : a) gradient de sucrose avec bande basse fléchée (muscle jaune) b) particules purifiées en MET sans coussin de sucrose préalable c) coussin de sucrose avec la bande correspondant aux débris tissulaires de la palourde (⬭) et le culot de particules (**) d) particules purifiées en MET avec l'étape préliminaire sur coussin de sucrose.

2.3.2 Caractérisation moléculaire de l'agent infectieux et étude du développement de la BMD

2.3.2.1 Analyse protéique

A partir des particules purifiées sur gradient de sucrose, une analyse protéique a été réalisée (**Figure 17**). Cinq bandes majoritaires ressortent sur l'ensemble du profil protéique du muscle marron analysé en gel NuPage 12 % Bis-tris: 45 kDa, 29 kDa, 17 kDa, 39 kDa, et une bande supérieure à 200 kDa. Après migration électrophorétique, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF afin de pouvoir réaliser un séquençage de ces 5 bandes majeures.

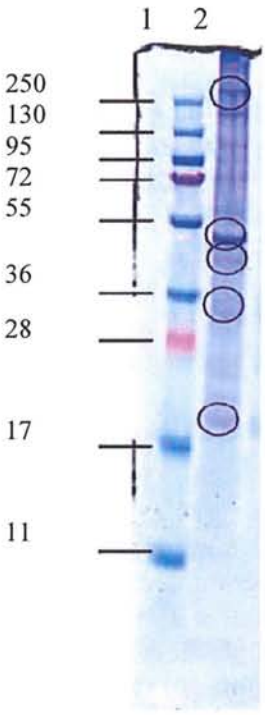


Figure 17 : Profil protéique obtenu après migration en Gel NuPage 12 % Bis-Tris des particules purifiées à partir du muscle marron (piste 2). Piste 1 marqueur de poids moléculaire.

La première approche utilisée par fragmentation par spectrométrie de masse MS/MS a permis d'obtenir de courtes séquences d'acides aminés pour l'ensemble des bandes protéiques. Tous les peptides générés ont été comparés aux séquences disponibles dans les banques de données uniprot version 2010 à l'aide de l'interface BLAST disponible sur le site du NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). La seule homologie significative retrouvée avec des protéines connues a été l'actine pour la bande à 45 KDa (92% identité). Cette bande protéique correspond vraisemblablement à du muscle de palourde encore présent dans notre purifiat. Pour le reste des 4 bandes protéiques, il est à noter que les séquences en acides aminés obtenues ont été malheureusement trop courtes et n'ont donc pas permis de déterminer de façon fiable les homologies. La seconde approche par séquençage selon la méthode d'Edman n'a quant à elle pas permis d'obtenir des résultats en raison des trop faibles concentrations en protéines présentes sur les membranes PVDF envoyées, empêchant par conséquent l'atteinte du seuil de sensibilité de cette méthode.

Après amélioration du protocole de purification, les protéines ont été une nouvelle fois analysées sur gel NuPage. Les mêmes bandes majeures ont été retrouvées. Notons cependant que la bande à 45 KDa était moins présente lors de ces analyses, montrant l'efficacité d'une pré-purification sur coussin de sucrose 30%. Ces 5 bandes majeures ont été découpées dans le gel ainsi que celles situées à 100, 120 et 200 KDa et envoyées à la plateforme Proteogen de l'université de Caen (http://icore.unicaen.fr/plateformes/proteogen/) afin d'y être analysées par MALDI-TOF MS. Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence des homologies significatives avec des protéines virales ou de palourde disponibles dans les banques de données pour la majorité des bandes protéiques étudiées. Une nouvelle fois, seule la protéine de 45 KDa s'est révélée être de l'actine de palourde. Le manque d'homologie pour les autres bandes protéiques peut être expliqué par le mode d'analyse réalisé par la MALDI-TOF MS. En effet, cette technique génère, à partir de protéines entières, un fractionnement en petits fragments peptidiques dont la masse est ensuite déterminée. L'ensemble des masses obtenues est ensuite comparée à celles générées par des protéines déjà analysées. Seule des homologies de 100% peuvent alors être décelées par cette approche. Nos

résultats suggèrent que les protéines de l'agent étiologique de la BMD ne correspondent à aucune protéine virale connue à ce jour.

2.3.2.2 Immunisation de souris et obtention d'anticorps polyclonaux

Un lot de 5 souris femelle BalbC a été injecté par voie sous-cutanée avec 100 µL/souris, contenant un mélange de 6,7 µL d'agent pathogène purifié, 26,7 µL de tampon TEN 1X et 66,7 µL d'adjuvant complet de Freund. Trois injections ont été réalisées à 15 jours d'intervalle. Des prélèvements de sang ont été effectués au niveau de la veine sub-mandibulaire après 28 et 41 jours d'expérimentation (soit après deux et trois injections respectivement). Un western-blot a ensuite été réalisé avec le sérum de ces souris et a permis la mise en évidence des protéines les plus fortement immunogènes. Les cinq souris possèdent le même profil. Ainsi, ce sont des protéines situées à 100, 120, 200 et > 250 kDa qui ont entraîné la production d'anticorps. Cette réaction immunitaire des individus signifie donc que ces protéines sont probablement des protéines majeures caractéristiques de l'agent pathogène.

2.3.2.3 Adaptation à la culture cellulaire

- **Sur lignées cellulaires de poissons**

Deux séries d'expérimentations ont été effectuées sur trois lignées cellulaires infectées avec la bande basse pure obtenue lors de la purification de l'agent pathogène et également incubées à différentes températures :
- Cellules BF (Bluegill fish fibroblast) : températures 20 – 15 – 10°C;
- Cellules RTG (rainbow trout gonad) : 20 – 15 – 10°C
- Cellules EPC (cellules épithéliales de carpe) : 28 – 20 – 15 – 10 °C

Différentes conditions de culture ont été testées : avec sérum de veau fœtal ou sans sérum, ainsi que différentes dilutions de l'agent pathogène (-1 dilution 1/10 ; -2 dilution 1/100 ; -3 dilution 1/1000). Les cellules ont été préparées la veille sur des plaques afin d'être à confluence. Le lendemain, l'adhésion des cellules au fond des puits a été contrôlée par observation microscopique. Les lignées ont été ainsi mises en contact pendant une heure avec 50 µL par puits de préparation contenant l'agent pathogène (5 µL d'agent purifié + 45 µL de milieu Eagle modifié sans sérum ou avec 2 % de sérum DEAE).
Cependant, aucun effet cytopathogène n'a été observé au cours des tests de culture cellulaire. Ces résultats suggéraient que soit nos particules avaient perdu leur virulence lors du processus de purification sur gradient de sucrose, soit que les lignées cellulaires utilisées étaient inadéquates pour la culture de cet agent de la BMD.

- **Sur primo-culture de palourdes.**

Aucune lignée cellulaire de palourde n'étant disponible à ce jour, nous nous somme orientés vers la réalisation de primocultures. Pour réaliser ces primocultures, nous nous sommes rapprochés du laboratoire FRE3484 CNRS INEE – UNICAEN, spécialisée dans l'étude des bivalves marins. Deux compartiments cellulaires ont été choisis lors de cette approche, le muscle et l'hémolymphe. Les capacités de ces cellules à adhérer au support de culture et à se multiplier ont été déterminées avec différents matériaux et milieux de culture.
Le suivi de la survie et de la prolifération des cultures est réalisé par une méthode de spectrophotométrie. L'expansion du nombre de cellules viables semble induire une augmentation de l'activité déshydrogénase mitochondriale (à moins que ce ne soit juste l'acclimatation au substrat ou simplement les processus mis en jeu au cours de l'adhésion). Cette dernière est déterminée en ajoutant au milieu du WST-1 (substrat de la déshydrogénase) et en suivant la formation de formazan à 415 nm. Les tests ont été réalisés à 17°C, une cinétique du temps d'incubation a été réalisée. Dans ce test, la concentration initiale de cellule était de 105 000 cell/puits.

Les résultats obtenus montrent qu'une apparente prolifération des cellules est observable dès 8h d'incubation (**Figure 18**). Il reste à vérifier qu'il y a bien division cellulaire complète.

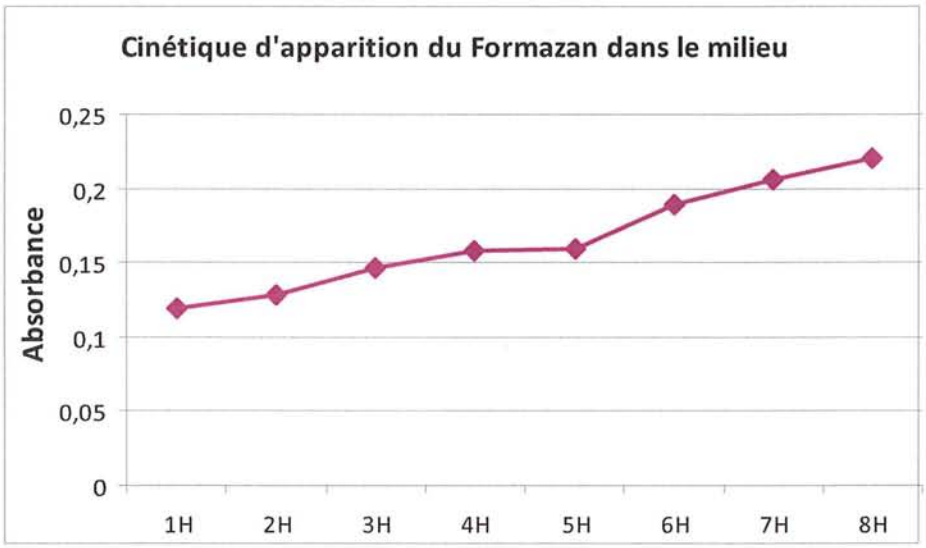


Figure 18 : Cinétique de l'apparition du formazan dans le milieu

La durée de vie de ces primocultures a également été déterminée. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de maintenir des lignées primaires de palourdes durant une bonne semaine. Cependant, les différents tests montrent des résultats peu reproductibles. En effet, d'un test à l'autre, les mesures d'absorbance diffèrent pour un nombre initial de cellules équivalent. La qualité des cellules semble également très variable. En effet, la proportion de cellules adhérentes a été très aléatoire au cours des tests (de 20% à 100% selon les tests). Notons également que la culture réalisée à partir de cellules hémocytaires semble plus adéquate. En effet, une meilleure adhérence cellulaire a été observée. De plus l'apparition de contamination est plus souvent mise en évidence dans les primocultures de cellules musculaires que dans celles d'hémocytes. Malgré une relative variabilité dans la reproductibilité des tests réalisés, les premiers résultats de cultures primaires sont relativement encourageants.

2.3.2.4 Caractérisation génomique

Dans un premier temps, la nature des acides nucléiques composant ce génome a été déterminée : une extraction des acides nucléiques a été réalisée via deux étapes d'extraction au phénol-chloroforme. Le matériel extrait a ensuite subi un traitement soit à la RNaseA soit à la DNaseI. Les échantillons ont été déposés sur un gel d'agarose 1% et visualisés aux UV. Le matériel purifié de la bande basse obtenue à partir du muscle marron montre que le génome de l'agent pathogène serait constitué d'ARN (**Figure 19**).

Pour tenter de cloner ce génome, les ARNs totaux ont été extraits à l'aide d'un kit d'extraction des ARNs viraux (QIAamp, QIAGEN). Les ARNs extraits ont été rétro-transcrits en ADNc puis ligués au plasmide PGEM7Zf (+). Après transformation bactérienne, une PCR a été réalisée à l'aide des amorces T7/Sp6 pour chacune des colonies ayant intégré un plasmide. Les produits d'amplification ont été visualisés sur gel d'agarose. Des inserts de 200 à 500 pb ont été obtenus et ont été envoyés au séquençage. Cependant, les séquences obtenues ne montraient aucune homologie significative lors des interrogations de banques de données.

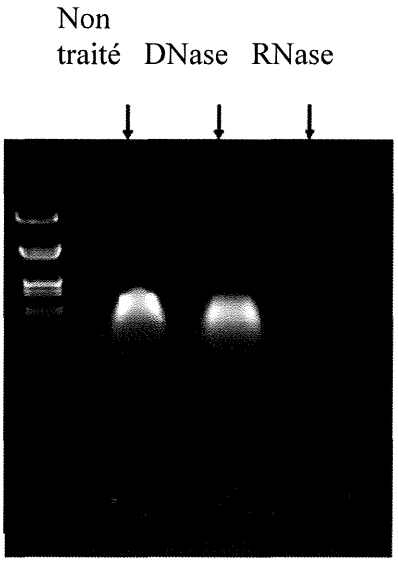


Figure 19 : Analyse en gel d'agarose 1% des acides nucléiques extraits des particules purifiées à partir de muscle marron.

2.3.3 Conclusions et Perspectives

Cette étude a permis de mettre au point certaines techniques afin de caractériser le pathogène responsable de la maladie du muscle marron chez la palourde japonaise du bassin d'Arcachon. Des particules de type virales ont ainsi pu être purifiées et observées en microscopie électronique à transmission confirmant ainsi les premières observations réalisées en amont de ce travail. Cependant, l'utilisation de gradients de sucrose ne permet pas encore d'obtenir des particules parfaitement pures comme en témoignent nos résultats de séquençage protéique et de clonage. En effet, des fragments de muscle de palourde co-purifient encore avec ces particules et gênent ensuite nos différentes analyses. Ces résultats démontrent la nécessité d'améliorer la technique de purification de l'agent pathogène afin d'obtenir de manière standardisée une seule bande concentrant seulement les particules virales. Dans cette optique, un protocole de purification sur gradient de ClCs, plus résolutif, est actuellement en cours de validation. Il devrait permettre de réaliser un gain non négligeable de pureté lors de nos isolements de particules pathogènes.

Des bandes protéiques ont pu être isolées sur gel et identifiées grâce notamment à l'obtention d'anticorps polyclonaux chez des souris BalbC. Ces bandes pourraient ainsi correspondre à des protéines virales immunogènes. Cependant, nos tentatives de séquençage protéique, en utilisant diverses techniques, ne nous ont pas permis d'identifier l'agent responsable de la BMD. L'amélioration de notre technique de purification des particules virales, mais également le développement des cultures sur cellules hémocytaires de palourde devraient nous permettre d'obtenir de plus grandes quantités de cet agent, pré-requis nécessaire à un séquençage de ces protéines majeures par la méthode d'Edman. Notons également que l'obtention d'anticorps polyclonaux pourrait à plus long terme permettre l'immuno-détection de l'agent pathogène.

3 Le microbiote des palourdes

(Tâches 1.5, 3.4 : G. Meisterhans, **N. Raymond***, F. Jude-Lemeilleur, L. Bourasseau, I. Paul-Pont, P. Soudant, C. Lambert, N. Le Goïc, N. Savoye, X. de Montaudouin, F. Garabétian)

3.1 Caractérisation des 2 habitats et des 2 sous-populations de palourdes considérés

Objectifs : Démontrer le caractère contrasté en termes de microbiotes des sous-populations de palourdes, ainsi que de leur habitat associé, en préambule à l'étude sur les « interactions procaryotes des palourdes / procaryotes du sédiment » (§ 3.2 & 3.3).

3.1.1 Méthodologie

Les deux habitats ont été caractérisés sur la base de mesures physico-chimiques récemment publiées (Dang et al. 2010b) et des données acquises dans ce projet (§ 2.1) (**Tableau 9**). La caractérisation de la structure des communautés bactériennes associées aux sédiments des deux sites a été réalisée par une mesure de l'abondance des procaryotes par cytométrie en flux (Amalfitano & Fazi 2008) et un génotypage des communautés par méthode ARISA de l'ITS 16S-23S (méthode ARISA, *Automatised Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* selon la méthode développée par Ranjard et al. 2000). L'électrophorégramme obtenu sur séquenceur ABI3730 est traduit sous forme d'une matrice d'abondance relative puis une matrice de similarité entre profils (indice de Bray-Curtis), grâce au logiciel Primer V06 (PRIMER-E Ltd).
Sur chaque habitat 5 palourdes ont été prélevées. Leur taille (mm), leur indice de condition (en ‰, poids de tissu sec (mg)/ poids de coquille sèche (g) (Walne & Mann 1975), leur signature isotopique ($\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$) [mesurée par spectrométrie de masse (IRMS), selon Dang et al. (2009d)], ainsi que leur taux d'hémocytes totaux, taux de phagocytose (% de cellules actives ayant phagocyté plus de 3 billes en 2h00 à 18°C) (mesurés par cytométrie en flux (Delaporte et al. 2003)) ont été déterminés.

3.1.2 Résultats et Discussion

3.1.2.1 Deux habitats différenciés

Arguin (site A) apparait comme un habitat océanique dont le plancton est plus riche en cyanobactéries, en chlorophylle, et dont la salinité autour de 34 varie peu contrairement à celle de la Station 11 (site B) dont la dessalure bien que modérée (autour de -4) signale un habitat sous influence continentale (**Figure 20, Tableau 9**) dont le nanoplancton est plus riche en pico-eucaryotes, nano-eucaryotes, cryptophycées et bactéries hétérotrophes.

Figure 20 : Localisation des sites de prélèvements.

* Rédacteur principal

Tableau 9 : Comparaison de quelques paramètres environnementaux entre les sites A (Arguin) et B (station 11)

	Arguin (A)	Station 11 (B)
Température moyenne sédiment (°C)	15,1	16,1
Température minimum sédiment (°C)	0,2	-1,7
Température maximum sédiment (°C)	30,0	43,7
Salinité moyenne		29,9
Salinité minimum	32,2	4,8
Salinité maximum	34,2	26,7
% immersion	70	53
Médiane granulométrique (µm)	360	96
% de pélites	3,5	29
% de matière organique dans sédiment	1,0	5,5

Les deux sites se démarquent également par leur caractéristique sédimentaire puisque l'on peut distinguer un habitat sédimentaire sableux (Arguin) et un habitat vaso-sableux (Station 11) qui se différencient plus par la structure des communautés bactériennes qui les constituent (**Figure 21**) que par l'abondance des procaryotes (**Figure 22**) :

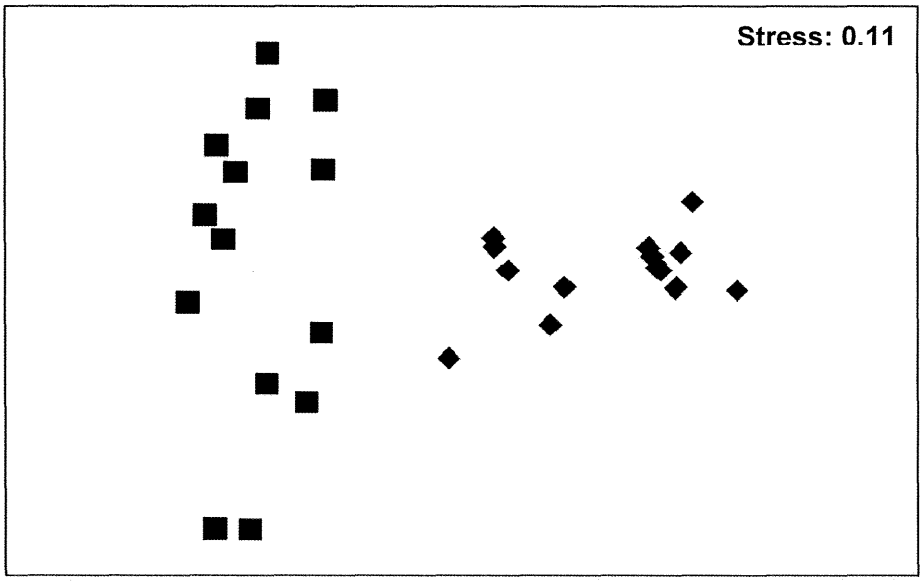


Figure 21 : Représentation de la matrice de similarité (indices de Bray-Curtis) de la diversité bactérienne des sédiments d'Arguin (carrés) et de la Station 11 (losanges) (données des Tâche 1.5 et Tâche 3.4 poolées). Les communautés bactériennes des sédiments d'Arguin et de la Station 11 sont significativement différentes (1 way- ANOSIM, R= 0,847, p <0,01). Un symbole = une date à une profondeur

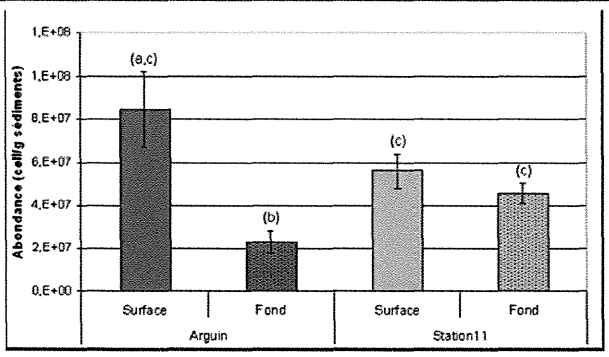


Figure 22 : Abondances procaryotes mesurées dans les sédiments d'Arguin et de la Station 11 sur 2 horizons (surface = 0-0,5 cm et fond = 3-5 cm) ; 14 réplicats (données des Tâche 1.5 et Tâche 3.4 poolées). Les lettres différentes distinguent des abondances différentes au seuil de 5% (test de Mann Whitney).

3.1.2.2 Deux sous-populations de palourdes différentes

Les deux sous-populations (A, Arguin) et (B, station 11) se différencient par :

- **<u>la longueur des coquilles (en mm) et leurs indices de condition</u>** puisque les valeurs obtenues (**Figures 23**) confirment que ces 2 sous-populations présentent des caractéristiques physiologiques différentes. Les valeurs que nous avons obtenues sont comparables à celles observées antérieurement (Dang, 2009) : les palourdes d'Arguin sont en moyenne plus grandes et mieux remplies (45 mm ; 61) que celles de la Station 11 (29 mm ; 39).

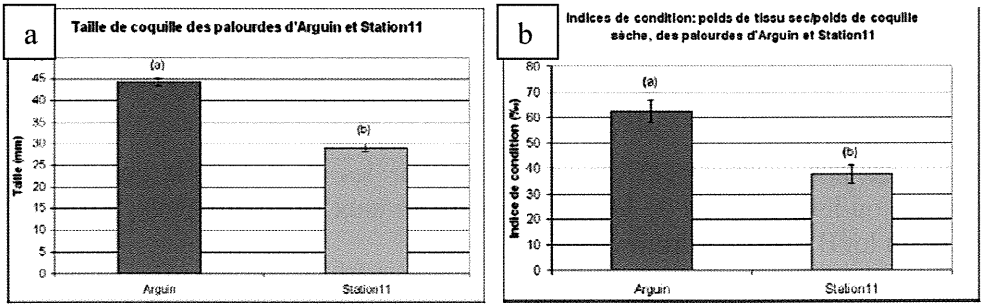


Figure 23 : Taille (mm) (23a) et indices de condition (23b) (poids de tissu sec / poids de coquille sèche) des palourdes prélevées en avril et novembre 2010 à Arguin et Station 11 (n=10). Les lettres différentes distinguent des valeurs différentes au seuil de 5% (test de Mann Whitney).

- **<u>leur signature isotopique</u>** (**Figure 24**), en particulier le $\delta^{13}C$ qui différencie les palourdes d'Arguin de la Station 11 pour les deux périodes de prélèvements : printemps (Avril P1) et automne (Novembre A1). En accord avec des résultats récemment obtenus sur le bassin d'Arcachon (Dang et al. 2009d) ces signatures différentes traduiraient une différence de ressource trophique. D'après les signatures $\delta^{13}C$, la Station 11 est plus sous l'influence microphytobenthique et Arguin plus sous l'influence phytoplanctonique (Dubois, 2012).

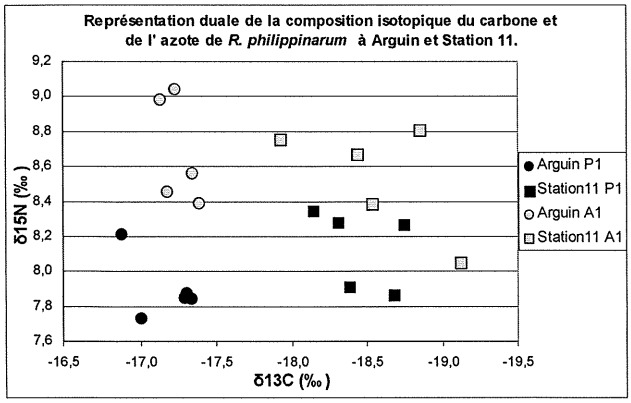


Figure 24 : Représentation duale de la composition isotopique en $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ dans les muscles adducteurs des palourdes d'Arguin et de la Station 11 prélevées au printemps (P1, Avril) et à l'automne (A1, Novembre) (5 individus par site et par temps). Signature isotopique différente entre Arguin et Station 11 : $\delta^{13}C$ ($p<0,05$) et $\delta^{15}N$ ($p<0,05$ à P1).

- **<u>leur paramètre immunitaire</u>**

Le nombre d'hémocytes totaux (THC) est significativement plus élevé dans l'hémolymphe des palourdes du lot A ($1,26 \pm 0,41.10^6$ cellules/ml d'hémolymphe) que dans celle des palourdes du lot B ($0,12 \pm 0,02.10^6$ cell/mL hémolymphe ; $p= 0,003$).

Ce paramètre, même s'il doit être interprété avec précaution car dépendant de plusieurs autres paramètres (température, exposition aux pathogènes et aux contaminants, etc...) semble montrer que les palourdes du lot B sont immunodéprimées (**Figure 25**).

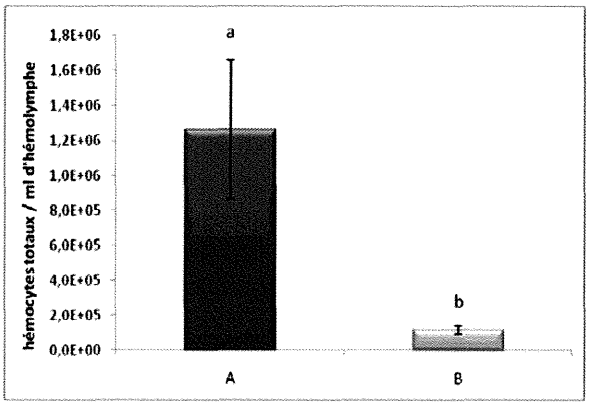


Figure 25 : THC (hémocytes/ml d'hémolymphe) de n= 12 échantillons d'hémolymphe pour les palourdes des lots A et B. Les lettres différentes distinguent des valeurs différentes au seuil de 5%.

Le taux de phagocytose (donnée non représentée) est identique pour les deux lots de palourdes excepté en automne (novembre) où les individus du lot A présentent un taux de phagocytose 0,7 fois inférieur à celui des individus du lot B (Mann-Whitney, $p<0,01$).

3.1.2.3 Conclusion

Les deux lots de palourdes étudiés, avec leurs états physiologiques, leurs paramètres immunitaires, leurs ressources trophiques hautement différenciées sont, comme nous l'attendions et en accord avec les travaux de Dang et al. (2009d), bien à considérer comme deux sous-populations du bassin d'Arcachon; les palourdes du site A ayant une meilleure capacité de croissance et un meilleur état physiologique que celles du site B. Compte tenu de leurs caractéristiques physiologiques, il peut être considéré que les palourdes du lot A constituent une sous population de référence en termes « de bon état de santé », dans le bassin d'Arcachon.

3.2 Spécificité des communautés bactériennes associées aux palourdes

Objectifs : Evaluer le degré de spécificité des communautés de bactéries (diversité, abondance, structure) par comparaison des communautés de l'habitat sédimentaire, par une analyse à l'échelle des tissus (respiratoire, digestif, autre). Première partie : par comparaison palourde/sédiment.

3.2.1 Méthodologie

L'analyse de la diversité des communautés bactériennes en termes d'abondance, de richesse et de structure a été réalisée sur :

- 6 palourdes provenant de chaque habitat (lot A, lot B) et sur 3 tissus pour chaque individu (branchie, tube digestif et reste de l'animal) afin de séparer d'un côté les tissus plus « internes » et de l'autre les tissus en interaction avec le milieu extérieur;
- sur 3 carottes de sédiment et sur 2 zones de profondeur distinctes, la zone 0-0,5 cm (surface) et la zone 3-5 cm (fond).

L'abondance bactérienne a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (nombre de copies du gène ADNr16S) (Lopez-Gutierrez et al., 2004) et cytométrie en flux (Amalfitano et Fazi, 2008) pour les palourdes et le sédiment respectivement; la diversité bactérienne a été déterminée par génotypage de l'ITS 16S-23S (méthode ARISA, selon la méthode développée par Ranjard et al, 2000). La structure des communautés bactériennes des différents tissus et lots de palourdes, ainsi que des matrices palourdes et sédiments, a été comparée à partir des similarités de Bray-Curtis, et représentée sous forme de MDS (Multi Dimensional Scaling).

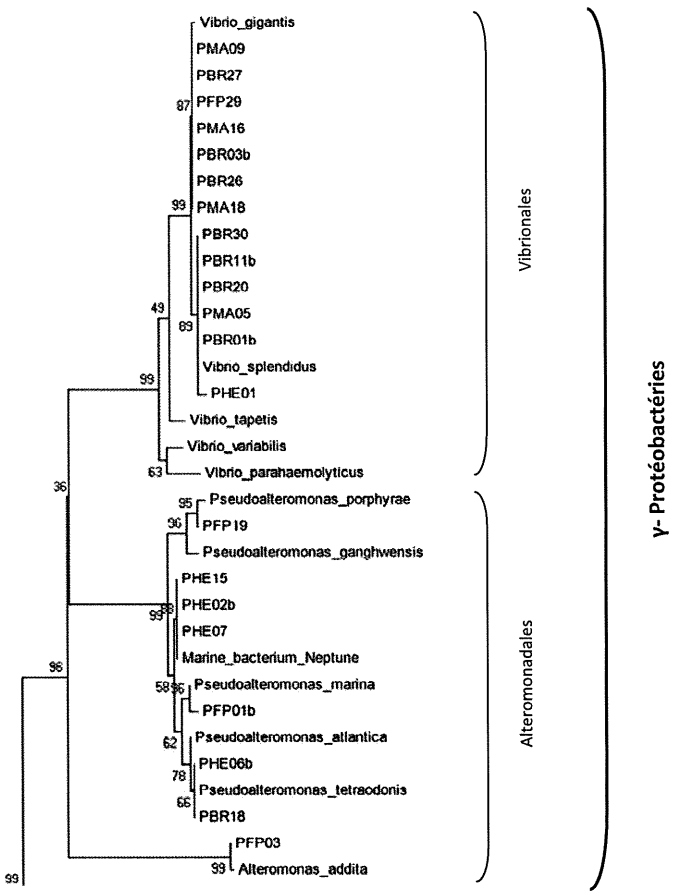
En complément de l'analyse des communautés bactériennes associées aux palourdes et au sédiment prévue initialement dans le cadre de ce projet, une collection de souches bactériennes a été constituée à partir de la fraction cultivable associée à 6 tissus (hémolymphe, fluides palléaux, manteau, branchies, tube digestif et masse viscérale) de 5 palourdes prélevées sur le site A en 2009 et ce pour en caractériser la diversité génétique et phénotypique. Toutes les colonies présentant un morphotype différent ont été isolées et cultivées sur Gélose Nutritive Marine (GNM, milieu non sélectif) et/ou Thiosulfate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS, milieu sélectif de *Vibrio* spp.). Les souches pures obtenues ont donc été caractérisées phénotypiquement (coloration de Gram, recherche des enzymes oxydase et catalase, et type respiratoire) et génotypiquement : leur ADNr 16S a été séquencé (Macrogen Inc., Seoul, Republic of Korea) et génotypé par ARISA (Ranjard et al, 2000)

3.2.2 Résultats et Discussion

3.2.2.1 Empreinte génotypique de la collection d'isolats

Cinquante-huit isolats de la collection ont été analysés. Le séquençage des gènes ADNr 16S a permis d'obtenir des contigs de 1 à 1,4 Kb et d'établir un arbre phylogénétique par la méthode de distances Neighbor Joining (**Figure 26**)

Figure 26



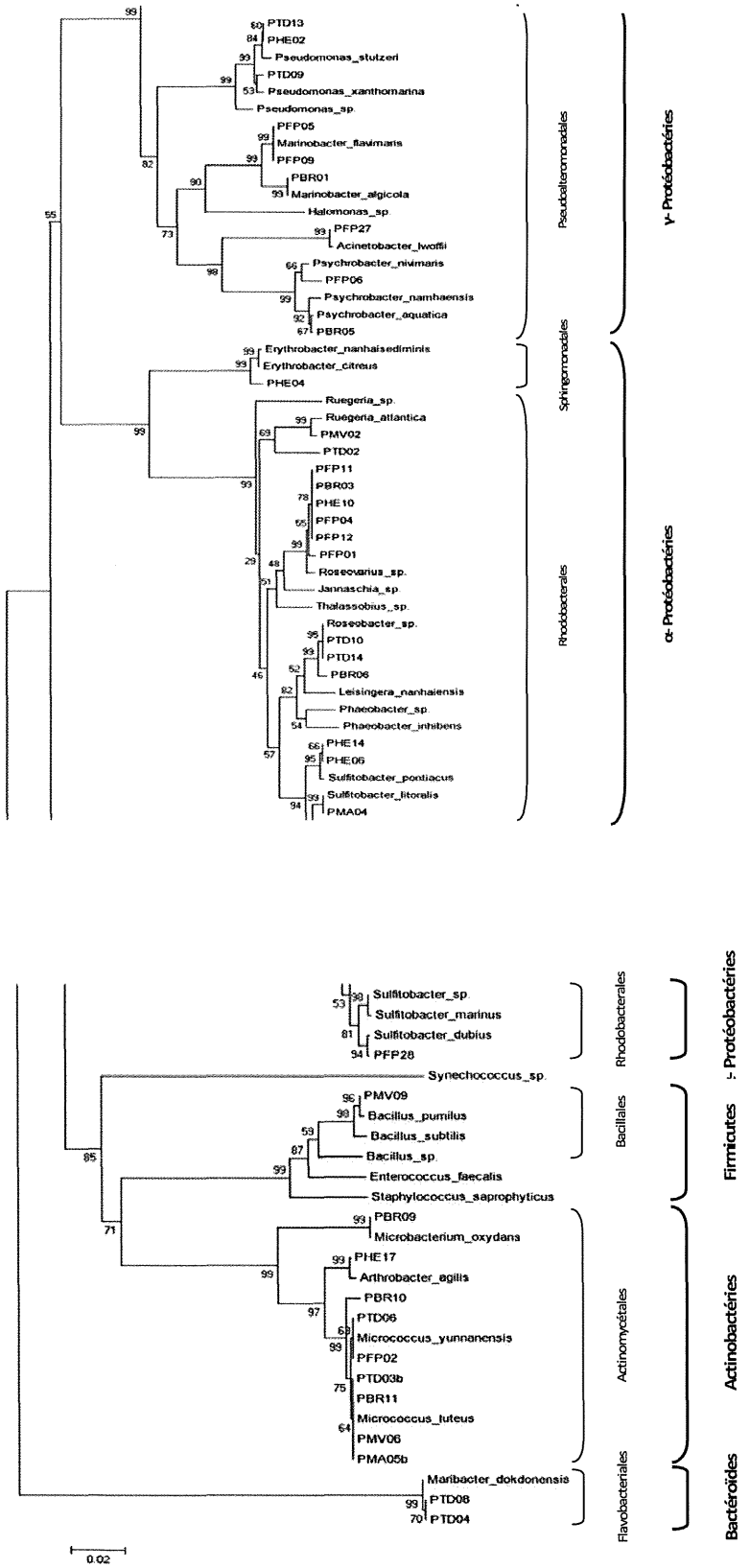


Figure 26: Arbre phylogénétique des 5 phylums, ordres et certaines espèces identifiés; robustesse de l'arbre évaluée par la méthode de boostrap à 100 répétitions.

La majorité des isolats (n=58) (51,7%) ont un plus proche voisin appartenant aux γ-protéobactéries, 27,6 % aux α-protéobactéries, 15,5 % aux Actinobactéries, 3,5 % aux Bactéroïdes et 1,7 % aux Firmicutes (**Tableau 10**).

Tableau 10: Caractéristiques génotypiques des souches bactériennes appartenant à une collection représentative de la fraction cultivable des communautés bactériennes associées à 6 tissus de la palourde.

Phyllum	Ordre	Nombre d'isolat	Taille des ITS en pb	Nombre d'ITS par isolat	Nombre médian d'ITS par isolat
γ-protéobactéries	*Vibrionales*	13	266 à 972	7 à 12	10
	Alteromonadales	8	426 à 918	2 à 10	3
	Pseudomonadales	9	**206** à 1082	2 à 13	7
α-protéobactéries	*Sphingomonadales*	1	762	**1**	1
	Rhodobacterales	15	209 à **1140**	2 à **31**	8
Actinobactéries	*Actinomycetales*	9	444 à 800	1 à 4	2
Bactéroïdes	*Flavobacteriales*	2	486 à 812	3 à 6	5
Firmicutes	*Bacillales*	1	504 à 540	4	4

Chaque isolat présente un nombre d'ITS variable, entre 1 et 31 ITS. Le nombre médian d'ITS par souche est de 6. La taille des ITS couvre la gamme de taille détectable, de 206 à 1140 paires de bases. Aucun de ces ITS n'a été identifié comme caractéristique d'un isolat ou d'un des groupes taxonomiques (ordre) auxquelles ces isolats seraient apparentés.
L'empreinte génotypique de la collection d'isolats permet de constater comme attendu que les espèces bactériennes ont un nombre variable d'opérons ribosomiques. Aucune relation simple ne peut donc être établie entre le nombre et le type d'ITS détecté, et la présence d'espèces bactériennes. Néanmoins, il est supposé que la richesse (nombre) et la composition (taille) en ITS reflètent bien la diversité taxonomique en bactéries (Fuhrman & Steele, 2008).

3.2.2.2 Nombre de copies d'ADNr16S bactérien et abondance procaryote

- **Entre tissus**

Le nombre de copies d'ADNr 16S bactérien, environ $1{,}6.10^{10}$ copies/g tissu, ne varie pas significativement entre les tissus des palourdes du lot A (p= 0,078) (**Figure 27**). En revanche, il varie entre les tissus des palourdes du lot B où il est significativement plus élevé dans les branchies (2,2 ± $0{,}6.10^{11}$ copies/g tissu) que dans le tube digestif (5,3 ± $1{,}2.10^{10}$ copies/g tissu) ou les restes (3,4 ± $1{,}3.10^{10}$ copies/g tissu) (p<0,001).

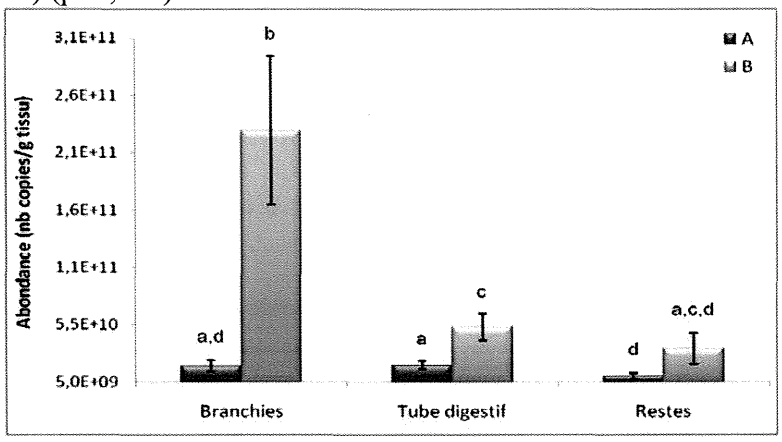


Figure 27 : Moyenne ± ES du nombre de copies d'ADNr 16S mesuré par PCR quantitative en temps réel dans n= 12 échantillons de branchies, tube digestif et restes de 2 lots de palourdes A (gris foncé) et B (gris clair). Les lettres différentes distinguent des abondances différentes au seuil de 5%.

- **Entre lots de palourdes**

Si l'on compare entre lots de palourdes, le nombre de copies du gène d'ADNr 16S ne varie pas (~ $5{,}4.10^{10}$ copies d'ADNr 16S/individu; p= 0,644). En revanche, la contribution de chaque tissu au nombre de copies d'ADNr 16S total est différente entre les deux lots. Ainsi pour le lot A la majorité de copies du gène d'ADNr 16S est retrouvée dans le reste à 69,7 %; dans les branchies à 25 ,3 % puis dans le tube digestif à 5 % ; pour le lot B la majorité est contenue dans les branchies à 54,2 %, dans le reste à 43 % puis dans le tube digestif à 2,8 % (**Figure 28**). Entre les 2 lots, les nombres de copies d'ADNr 16S sont significativement plus élevés dans les branchies ($p<0{,}001$) et tubes digestifs (p= 0,038) des palourdes du lot B.

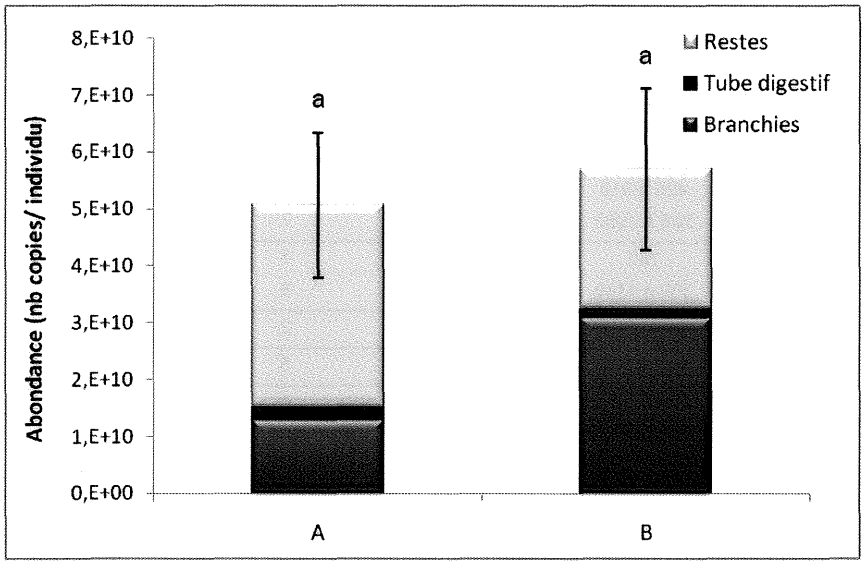


Figure 28 : Moyenne ± ES du nombre de copies d'ADNr 16S/ individu mesuré par PCR quantitative en temps réel dans n= 12 échantillons de branchie (gris foncé), tube digestif (noir) et reste (gris clair) des lots de palourdes A et B. Les lettres différentes distinguent des abondances différentes au seuil de 5%.

Les données d'abondance bactérienne dans les bivalves sont rares et la comparaison entre espèces et classes d'invertébrés est rendue difficile par la multiplicité des tissus étudiés, des outils et méthodes utilisés, et des expressions de l'abondance en bactéries (par g de tissu sec ou humide, par matrice, par mL d'homogénat, etc. ; (Harris, 1993). Des travaux que nous avons réalisés précédemment sur la palourde (*R. philippinarum*) et la coque (*Cerastoderma edule*) indiquent que l'abondance bactérienne, déterminée par épifluorescence, varie entre 10^6 et 10^{10} unités cellulaires (UC) par g/tissu frais chez la palourde (données non publiées) et 10^6 et 10^8 UC/individu chez la coque (Meisterhans et al, 2011) plaçant notre estimation par PCR quantitative en temps réel dans la même gamme de valeurs pour la même espèce (palourde) et dans une gamme supérieure pour des espèces différentes (palourde *vs* coque).

3.2.2.3 Richesse en ITS

- Entre tissus

La richesse totale en ITS des communautés bactériennes est variable entre tissus, de 112 à 163 ITS pour les tissus du lot A, et 126 à 147 ITS pour les tissus du lot B. Cependant, seulement 8 à 23 % des ITS détectés sont des ITS dits constants (ITS détectés dans au moins 10 échantillons sur 12). Il semble y avoir plus d'ITS constants dans les branchies mais c'est une tendance qui n'est pas vérifiée statistiquement (**Tableau 11**).

Tableau 11: Richesse en ITS des communautés bactériennes des lots de palourdes A et B sur 2x6 échantillons par branchie (Br), tube digestif (Td) et reste (Re).

	Lot A			Lot B			Individus	
	Br	Td	Re	Br	Td	Re	A	B
Richesse totale	112	143	163	147	135	126	196	177
% ITS constants	23	16	15	18	8	12	19	18

- Entre lots de palourdes

Les communautés bactériennes des palourdes du lot A semblent être plus riches en ITS que celles du lot B, mais cette différence ne peut pas être testée statistiquement (n=2). En revanche, le nombre d'ITS constants entre les individus des 2 lots ne semble pas varier. De plus, la majorité des ITS retrouvés dans les lots sont des ITS communs : 70,4 % des ITS retrouvés dans les branchies, 62,6 % des ITS des tubes digestifs et 58,8 % des ITS retrouvés dans les restes sont des ITS partagés par les lots A et B de palourdes (**Tableau 11**).

La richesse totale en ITS est une mesure délicate à interpréter car elle est très variable selon les tissus et les lots. En effet, 80% des ITS détectés sont des ITS présents ponctuellement, dans moins de 10 échantillons sur 12, et qui pourraient provenir, pour les tissus en interaction avec le milieu extérieur, des bactéries de la colonne d'eau, compartiment de l'écosystème marin très riche en procaryotes et variable en fonction des saisons ou des marées.

3.2.2.4 Diversité des communautés bactériennes

- Entre tissus

Pour les palourdes du lot A, les communautés bactériennes associées aux différents tissus apparaissent significativement différentes (p<0,001, R= 0,214) (**Figure 29a**). En revanche, pour les palourdes du lot B aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les communautés bactériennes associées aux différents tissus (p= 0,182, R= 0,029) (**Figure 29b**).

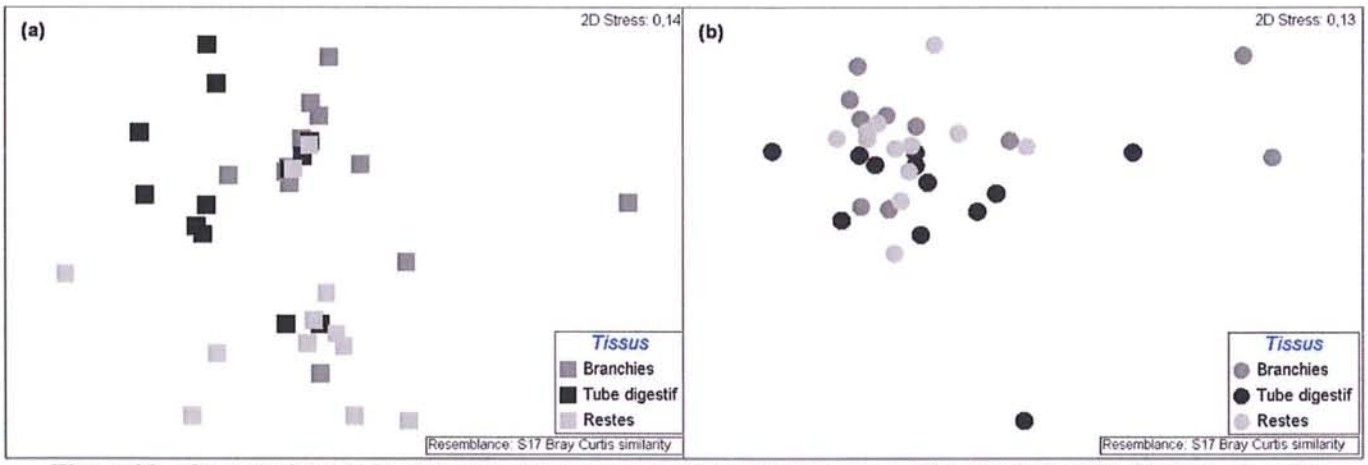


Figure 29 : Comparaison de la structure des communautés bactériennes associées aux branchies (gris foncé), tube digestif (noir) et restes (gris clair) représentée sous forme de MDS basées sur la matrice de similarité de Bray-Curtis. (a) : palourdes du lot A, (b) : palourdes du lot B.

Ce dernier résultat pourrait s'expliquer par le moins bon état physiologique des palourdes du lot B (IC = 39‰ et THC=0,12 cell/mL hémolymphe) hypothèse renforcée lors de la dissection des individus de ce lot, par l'aspect des chairs des tissus apparues plus fines et translucides voire déliquescentes que celles des palourdes du lot A. Ceci pourrait se traduire par une absence de barrière entre les tissus et favoriser ainsi la dispersion des bactéries au sein de l'ensemble des tissus.

- Entre palourdes

Les communautés bactériennes associées aux 2 lots de palourdes apparaissent significativement différentes (**Figure 30**) p= 0,033, R= 0,037). Toutefois la valeur de R, proche de 0, signale une différence peu marquée et la comparaison des 2 lots, tissu par tissu, révèle, uniquement pour le mois d'avril, que seules les branchies et le tube digestif présentent des communautés bactériennes différenciées entre les lots A et B (p= 0,5 %, R= 0,212). Au mois de novembre aucune différence n'est observée entre lots et ce quel que soit l'organe considéré.

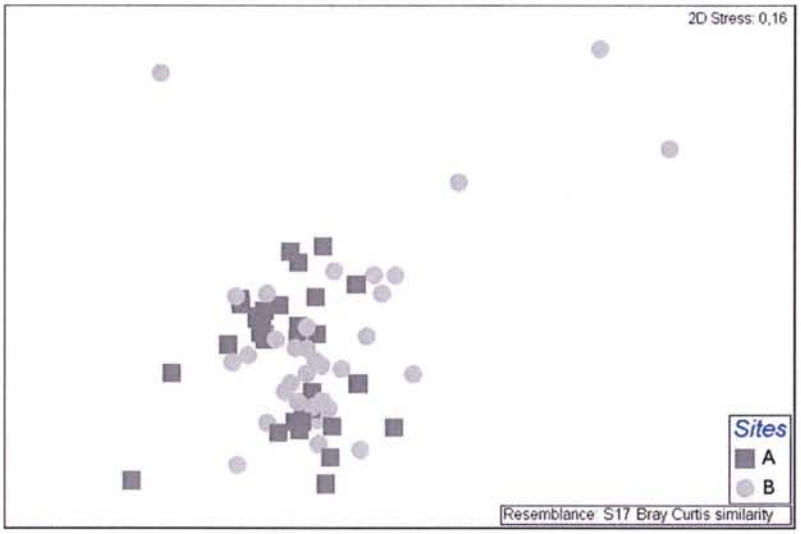


Figure 30: Comparaison des diversités des communautés bactériennes associées aux palourdes des sites A (carrés foncés) et B (ronds clairs) représentée sous forme de MDS basées sur la matrice de similarité de Bray-Curtis.

- Entre les matrices palourdes et sédiments

Quel que soit le site de prélèvement, les matrices palourdes et sédiments ont des communautés bactériennes bien distinctes ($p<0,001$, $R= 0,873$) (**Figure 31**). Toutefois, les 22 % d'ITS constants partagés entre les palourdes et le sédiment dans lequel elles vivent respectivement, confirment qu'elles acquièrent une partie de leur microflore de manière habitat dépendante.

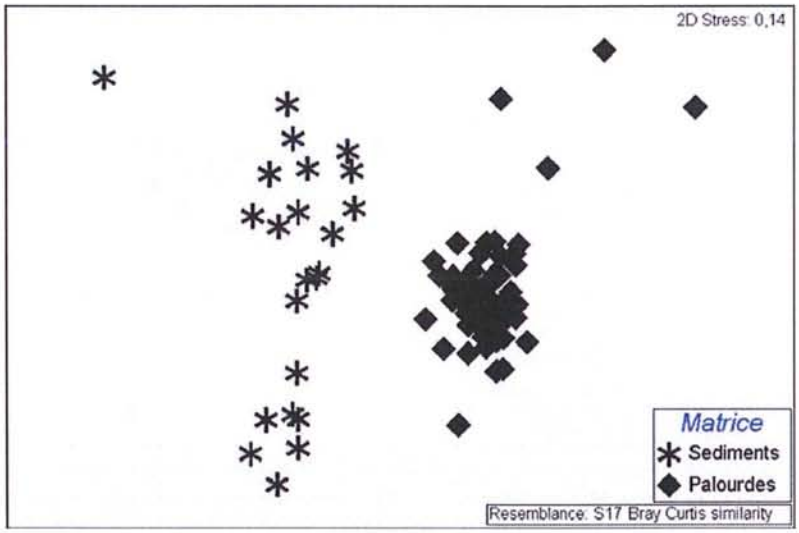


Figure 31 : Comparaison de la structure des communautés bactériennes associées aux palourdes (losanges) et sédiments (étoiles) représentée sous forme d'un MDS basée sur la matrice de similarité de Bray-Curtis. Les sites A et B sont poolés.

3.2.3 Conclusion

Les abondances des communautés bactériennes des deux lots de palourdes sont similaires, à l'échelle de l'individu et du tissu. La diversité des communautés bactériennes associées aux palourdes est différenciée entre les tissus, suggérant une compartimentation des communautés bactériennes dans la palourde. Par contre entre lots, il est plus difficile de conclure car la diversité des communautés est différenciée au mois d'avril (Br *vs* Td) ce qui n'est pas le cas au mois de novembre. On peut supposer un contrôle partiel des communautés bactériennes par les palourdes elles-mêmes.

3.3 Influence de l'habitat sur la flore bactérienne

Objectifs : Evaluer le degré de spécificité des communautés de bactéries (diversité, abondance, structure) par comparaison des communautés de l'habitat sédimentaire, par une analyse à l'échelle des tissus (respiratoire, digestif, autre). Seconde partie : par expérience de transplantation croisée.

Une expérience de transplantation croisée sur 6 mois, a eu lieu entre les deux sites aux caractéristiques bien distinctes, avec pour objectif l'étude de la dynamique de contamination/décontamination bactérienne des palourdes en fonction de leur environnement afin de caractériser les peuplements bactériens (abondance, diversité) et de les mettre en lien avec certains paramètres biologiques des palourdes, notamment immunitaires.

3.3.1 Méthodologie

En parallèle sur les deux sites (A et B), 660 palourdes ont été prélevées en avril 2010. De manière à différencier les deux lots, les coquilles des palourdes ont été marquées à l'aide de vernis selon un code couleur. Les palourdes de chaque lot ont ensuite subi une étape de dépuration de 6,5 jours dans un bassin (25 m^2) à flux d'eau déposée (Société CODIMER, Gujan-Mestras, France) (Furfari, 1966) afin d'homogénéiser leurs communautés bactériennes transitoires. Les lots de palourdes ont été ensuite soit réimplantés sur leur site d'origine soit transplantés sur le second site (**Figure 32**). Sur chaque site (A et B) et pour chacun des lots, 3 cages contenant chacune 55 palourdes ont été disposées afin de retrouver les individus réimplantés ou transplantés parmi la population autochtone.

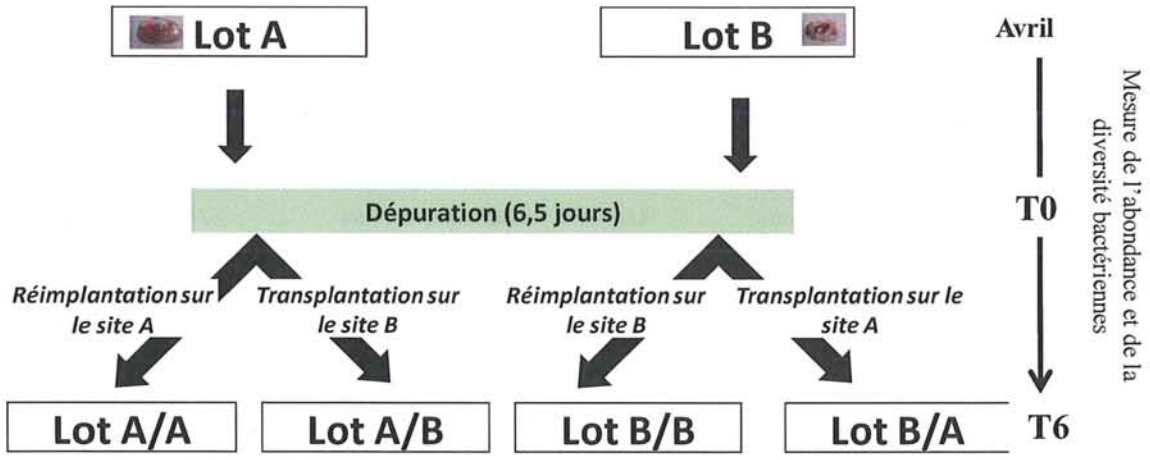


Figure 32 : Plan expérimental simplifié de l'expérience de transplantation croisée

L'expérience de transplantation a ainsi généré 4 lots de Rp: originaires d'Arguin (A) réimplantés sur Arguin (A/A) ou transplantés sur la Station 11 (B) (A/B), originaires de la Station 11 réimplantés sur la Station 11 (B/B) ou transplantés sur Arguin (B/A).

A la fin de la période de dépuration (T0) et 6 mois (T6) après la réimplantation/transplantation, 16 Rp par lot ont été échantillonnées. Sur ces individus les mêmes séries de mesures que celles réalisées lors de l'étude des deux lots de palourdes dans leur habitat naturel (tâche 1.5) ont été conduites :

- 6 individus pour réaliser la mesure de l'abondance bactérienne par PCR quantitative et de la diversité bactérienne par ARISA mais également celle des paramètres hémocytaires [concentration totale en hémocytes (THC); taux de phagocytose] par cytométrie en flux.

- 5 individus pour déterminer les caractéristiques physiologiques (longueur coquillière, indice de condition).

Les individus vivants restant à T6 ont été dénombrés afin de calculer un taux de survie des individus pour chaque lot.

3.3.2 Résultats et discussion

3.3.2.1 Dépuration

La dépuration de 6,5 jours n' a entraîné aucune modification des caractéristiques physiologiques que sont la longueur coquillière, l'indice de condition, le THC et le pourcentage de phagocytose pour les individus du lot A comme du lot B (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Caractéristiques physiologiques des individus des lots réimplantés (A/A, B/B) et des lots transplantés (A/B et B/A).

			Lot A/A	Lot B/B	Lot A/B	Lot B/A
Longueur (mm)	*Avant transplantation*	Moyenne	**45,2**	**29,4**	**45,2**	**29,4**
		Ecart type	2,2	3,4	2,2	3,4
	Après transplantation	Moyenne	**42,4**	**28,4**	**42,8**	**29,4**
		Ecart type	4	2,1	4,1	1,3
Indice de condition (‰)	*Avant transplantation*	Moyenne	**65,3**	**25,8**	**65,3**	**25,8**
		Ecart type	17,3	4,1	17,3	4,1
	Après transplantation	Moyenne	**61**	**29**	**34**	**62**
		Ecart type	**8**	**3**	13	9
THC (cell.mL^{-1})	*Avant transplantation*	Moyenne	**8,810^4**	**1,410^5**	**8,810^4**	**1,410^5**
		Ecart type	**8,710^4**	**1,0 10^5**	**8,710^4**	**1,0 10^5**
	Après transplantation	Moyenne	**1,0 10^6**	**1,6 10^5**	**1,8 10^5**	**8,410^5**
		Ecart type	**7,010^5**	**1,5 10^5**	**1,3 10^5**	**6,510^5**
Taux de phagocytose (%)	*Avant transplantation*	Moyenne	**64**	**62**	**64**	62
		Ecart type	12	11	12	11
	Après transplantation	Moyenne	**29**	**43**	**55**	**27**
		Ecart type	11	14	12	7

De même aucune différence significative de l'abondance bactérienne n'a été observée quelle que soit le lot.
L'analyse de la structure des communautés bactériennes montre qu'il y a une réduction de différence de structure entre les deux lots dépurés (2 way-ANOSIM, R= 0,141, p<0 ,05). En effet, pour les branchies uniquement, une différence de structure est observée (1 way-ANOSIM, R= 0,263, p<0 ,05) mais pas pour le tube digestif (Td) ni le reste des tissus (Re) (ANOSIM, p>0 ,05). La réduction de différence inter-lot se traduit également par une augmentation significative des similarités des communautés bactériennes associées au Re (avant dépuration: 43 ± 11% *vs* après dépuration: 69 ± 9 %). Par conséquent, il n'est observé entre les 2 lots dépurés, à l'échelle de l'organe, aucune différence de richesse taxonomique ni d'abondance relative des ITS des communautés bactériennes.

Comme attendu les populations bactériennes allochtones transitoires originaires des sites A (pour le lot A) ou B (pour le lot B) ont été remplacées par les populations bactériennes allochtones transitoires du bassin de dépuration conduisant à une augmentation des similarités entre les communautés bactériennes associées aux 2 lots de palourdes. Ce résultat est en accord avec ceux observés lors des reparcages de bivalves à des fins sanitaires (d'une durée minimum de 2 jours) et dont le but est d'éliminer des espèces bactériennes allochtones potentiellement pathogènes pour l'homme accumulées lorsque l'habitat naturel présente de manière ponctuelle ou persistante une mauvaise

qualité sanitaire (Furfari, 1966). Après dépuration, la similarité des communautés bactériennes associées au Td et aux Br entre les 2 lots de Rp valide le procédé de dépuration et renforce l'hypothèse que ces communautés sont majoritairement déterminées par l'habitat.

3.3.2.2 Réimplantation-transplantation

Après 6 mois de réimplantation-transplantation, des palourdes ont été prélevées sur chaque site de manière à comparer les caractéristiques physiologiques et la structure des communautés bactériennes entre lots réimplantés (lot A/A et lot B/B) et lots transplantés (lot A/B et lot B/A).

- **Comparaison des caractéristiques physiologiques entre les 4 lots de palourdes**

La taille (longueur de coquille) des individus n'a pas varié au cours de l'expérience (Mann-Whitney, $p>0,05$) (**Tableau 12**). La transplantation affecte les individus réimplantés et/ou transplantés sur le site B (comparés à ceux réimplantés ou transplantés sur le site A) au niveau de leur indice de condition. Le THC des palourdes du lot A/A est 6 fois plus importante que celle des palourdes du lot B/B (Mann-Whitney, $p<0,01$) mais le taux de phagocytose est identique entre ces deux lots de palourdes réimplantées (Mann-Whitney, $p>0,05$). Le THC et le pourcentage de phagocytose des palourdes transplantées sont significativement différents de ceux des individus de même origine et identiques à ceux des individus partageant le même habitat (Mann-Whitney) (**Tableau 12).**

- **Comparaison des communautés bactériennes entre palourdes transplantées (lots A/B et B/A) et palourdes réimplantées (lots A/A et B/B).**

En termes d'abondance, seules les communautés bactériennes associées aux branchies (Br) ont montré des différences. Les communautés bactériennes associées aux Br des palourdes transplantées sur un site ont la même abondance que celles des palourdes réimplantées sur le même site (lot A/B *vs* lot B/B ; lot B/A *vs* lot A/A (Mann-Whitney, $p > 0,05$). En revanche, les abondances diffèrent entre les lots transplantés et réimplantés de même origine (lotA/B *vs* lot A/A ; lot B/A *vs* B/B) (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Pour les autres organes, aucune différence d'abondance des communautés bactériennes n'a été observée entre les lots (Td : $1,4 \pm 1,9\ 10^{10}$ copies d'ADNr 16S. g^{-1} de tissu ; Re: $2,2 \pm 3,2\ 10^{10}$ copies d'ADNr 16S. g^{-1} de tissu ; Mann-Whitney, $p > 0,05$) (**Figure 33**).

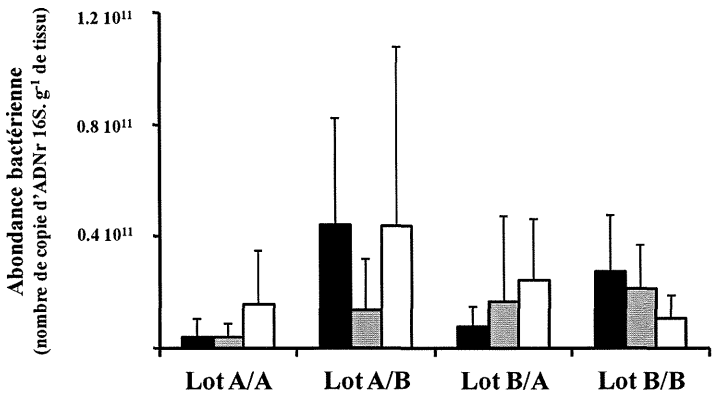


Figure 33 : Abondances bactériennes associées aux organes d'individus appartenant aux lots de palourdes réimplantés (lot A/A et lot B/B) ou transplantés (lot A/B et B/A). Branchies (Br): histogramme noir, tube digestif (Td): histogramme gris et reste des organes (Re): histogramme blanc. Les barres fines représentent les écarts-types

L'analyse des similarités de Bray-Curtis montre que la structure des communautés bactériennes est différente entre les palourdes réimplantées (A/A et B/B) et les palourdes transplantées (A/B et B/A) (2-way ANOSIM, R = 0,28 p < 0,01) (**Figure 34**)

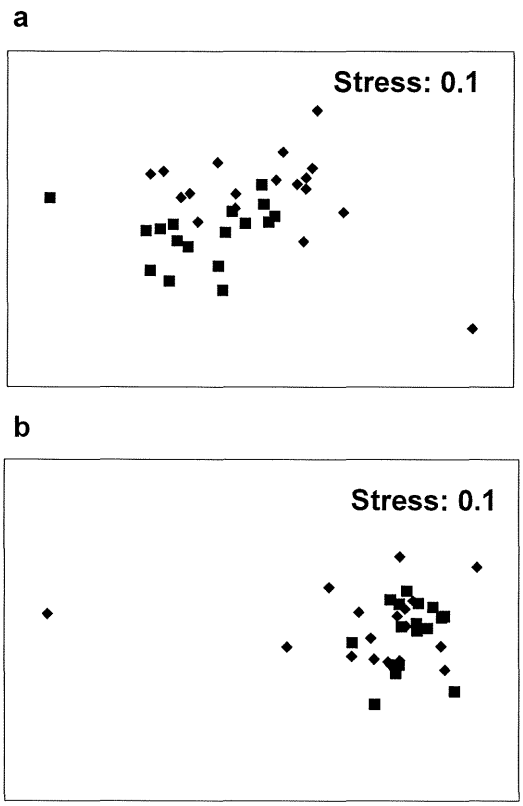


Figure 34 : comparaison de la structure des communautés bactériennes entre palourdes de même origine réimplantées ou transplantées (MDS : (a) lot réimplante A/A (carré) *vs* lot transplanté A/B (losange) ; (b) lot réimplanté B/B (losange) *vs* lot transplanté (B/A) (carré).

Ainsi, les communautés bactériennes associées aux branchies chez les individus diffèrent entre les palourdes transplantées (lot A/B ou B/A) et réimplantées (lot A/A ou B/B) qu'elles vivent, ou pas, dans le même habitat (1way-ANOSIM, **Tableau 13**).

Tableau 13 : Comparaison des communautés bactériennes entre lots transplantés (A/B et B/A) et lots réimplantés (A/A et B/B): valeur des R des 1-way ANOSIM. Les différences non significatives sont indiquées par la mention NS.

		Lot A/B	Lot B/A
Branchies	Lot A/A	0, 546**	0,511**
	Lot B/B	0,357*	0,376**
Tube digestif	Lot A/A	0,544**	NS
	Lot B/B	0,522**	0,231*
Reste	Lot A/A	0,651**	0,501**
	Lot B/B	NS	NS

Les communautés bactériennes associées au tube digestif chez les individus transplantés du lot A/B sont significativement différentes de celles associées au tube digestif de tous les individus réimplantés, qu'ils partagent le même habitat (lot B/B) ou la même origine (lot A/A) (1-way ANOSIM ; **Tableau 13**). En revanche les communautés bactériennes associées au tube digestif des individus transplantés du lot B/A sont identiques uniquement à celles des individus réimplantés d'origine différente mais partageant le même habitat (lot A/A ; 1-way ANOSIM p>0,05). Elles

différent donc de celles des individus réimplantés de même origine mais ne partageant pas le même habitat (lot B/B ; 1-way ANOSIM, **Tableau 13**).

Les communautés bactériennes associées au reste chez les individus transplantés du lot A/B sont significativement différentes de celles associées au reste des individus réimplantés de même origine (lot A/A) (1-way ANOSIM ; **Tableau 13**). Celles associées au reste chez les individus transplantés du lot B/A sont identiques uniquement à celles des individus réimplantés de même origine mais ne partageant pas le même habitat (lot B/B, 1way-ANOSIM, $p>0,05$). Elles différent donc de celles des individus réimplantés d'origine différente mais partageant le même habitat (lot A/A ; 1-way ANOSIM, **Tableau 13**).

Cette expérience de transplantation de 6 mois montre que les branchies et le tube digestif apparaissent comme les organes les plus sensibles au changement d'habitat puisque les communautés bactériennes associées aux individus des lots transplantés diffèrent de celles des individus des lots réimplantés. Ces résultats confortent l'hypothèse que ces organes sont des sites primaires de contamination bactérienne allochtone. La structure des communautés bactériennes associées aux organes internes (ie Re) n'évolue pas lorsque les palourdes sont réimplantées sur leur site d'origine ou transplantées sur l'autre site, sauf pour les palourdes (lot A) issues du site le plus favorable à la croissance des individus (site A : Arguin) transplantées sur le site le moins favorable à la croissance des individus (Site B : station 11), Le mauvais état physiologique des individus transplantés (taux de survie, THC, ...) suggère qu'une infection des tissus des individus échantillonnés pourrait être la cause des différences observées. Ces résultats suggèrent donc que la structure des communautés bactériennes associées aux organes internes est plutôt liée à l'état physiologique de l'hôte.

3.3.3 Conclusion

La comparaison des communautés bactériennes associées à deux lots de palourdes différenciées et provenant d'habitats contrastés met en évidence une structure différente à l'échelle de l'organe. Les communautés bactériennes associées au tube digestif qui est l'un des organes les plus en contact avec l'habitat apparaissent majoritairement déterminées par l'habitat alors que celles associées aux organes plus internes semblent majoritairement être déterminées par l'hôte lui-même. Ces hypothèses sont renforcées par les résultats obtenus sur la comparaison des communautés bactériennes associées aux organes internes chez la palourde et chez la coque *Cerastoderma edule* vivant en sympatrie : en effet les communautés bactériennes sont significativement différentes entre ces deux bivalves (Paul-Pont et al, in prep.). Les communautés bactériennes associées aux organes internes pourraient être le résultat d'un contrôle de l'hôte ou celui d'une co-évolution entre l'hôte et sa microflore associée due à des pressions de sélections communes. Les communautés bactériennes associées aux branchies présentent un déterminisme qui semble plus complexe, ces communautés étant à la fois influencées par l'habitat et par la position taxonomique de l'hôte.

3.4 Conclusion générale

En résumé, les lots de palourdes étudiés présentent des communautés bactériennes significativement différenciées de celles des sédiments dans lesquels nous les avons échantillonnées. Nous n'avons pas testé les communautés bactériennes de l'eau et du seston dont elles se nourrissent pour compléter cette comparaison entre les palourdes et leur biotope. Chez la langoustine cependant, une relation a été établie entre les variations saisonnières de la composition des communautés bactériennes du plancton et celle des communautés bactériennes du tube digestif des individus (Meziti et al., 2010). C'est la raison pour laquelle nous avions choisi d'étudier séparément 3 types de tissus : tube digestif, branchies, et reste des tissus et organes. En effet certains organes, comme le tube digestif ou les branchies, sont par les fonctions qu'ils réalisent plus en contact avec les flores environnantes que d'autres organes dits internes. Nous avons donc émis l'hypothèse que les communautés bactériennes associées à ces organes ne répondraient pas de façon identique selon le lot de palourdes étudié (année,

site). En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que quels que soient le site ou la période de l'année considérés, des communautés bactériennes significativement différentes sont associées au tube digestif, aux branchies et au reste des tissus au sein d'un même lot d'individus. Alors que les lots de palourdes analysés à partir des deux sites prospectés s'avèrent être constitués d'individus aux caractéristiques biologiques tranchées, les communautés bactériennes associées à ces individus et/ou à leur tissus, ne sont pas systématiquement différenciées. De plus, en manipulant le lien entre individus hôtes et habitat par une expérience de réimplantation-transplantation, nous avons pu confirmer ces tendances. Les communautés bactériennes associées au tube digestif et aux branchies s'avèrent plus réactives au changement d'habitat que celles associées au reste des tissus. Cela confirme que ces organes ne sont pas des cibles équivalentes pour une infection primaire par des bactéries allochtones, ou mécanisme de transmission latérale. La voie trophique, est par exemple chez l'huître la voie utilisée par *Salmonella enterica* Newport qui pénètre ensuite les tissus conjonctifs profonds de façon relativement prolongée (survie jusqu'à 2 mois) (Morisson et al., 2012). Or cette capacité infectieuse ne serait pas due aux îlots de pathogénicité SPI-1 et SPI-2 présents chez cette souche puisque des mutants *knock out* pour SPI-1 et 2 conserveraient le même taux de survie que la souche sauvage suggérant un mécanisme d'infection atypique. On peut penser que ce cas particulier pourrait illustrer un des mécanismes à l'œuvre pour l'acquisition, par la palourde, de sa « flore utile ».

4 Ecotoxicologie : métaux et efflorescences toxiques

(Tâches 1.3, 1.6, 3.2, 3.3 : **M. Baudrimont***, **H. Hégaret***, **P. Lassus***, **P. Soudant***, J. Abraham, C. Rocher, **A. Legeay***, **D. Tran***, C. Lambert, Z. Amzil, M. Sibat, M. Bardouil, I. Paul-Pont, P. Gonzalez, P. Soudant)

4.1 *Contamination* in situ *(bassin d'Arcachon)*

Objectifs : définir les niveaux de contaminations métallique et toxinique dans les palourdes du bassin d'Arcachon

4.1.1 Contamination métallique

4.1.1.1 Méthodologie

Des prélèvements *in situ* sur les 6 sites géographiques (stations 1, 11, 16, 29 et 36, **Figure 4**) ont été réalisés à fréquence saisonnière sur deux années : printemps 2010 (P1), été 2010 (E1), automne 2010 (A1), hiver 2011 (H1), printemps 2011 (P2), été 2011 (E2), automne 2011 (A2), hiver 2012 (H2) et printemps 2012 (P3). Au minimum 15 individus par site ont systématiquement été prélevés et analysés : bioaccumulation de 4 métaux majeurs (Cd, Cu, Zn et Hg) par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) au niveau de 3 organes (branchies, glande digestive et reste des tissus) et concentration en métallothionéines (MT), protéines de détoxication des métaux, par la méthode de saturation au mercure, au niveau des même trois organes. Sur un nombre plus limité de prélèvements (A1, P2, A2, H2 et P3), des analyses multi-éléments de 12 métaux ont été ou sont encore en cours de réalisation au niveau des organismes entiers par ICP-MS (Centre commun d'analyse de La Rochelle) et ICP-OES (UMR EPOC, équipe EA). Enfin, des analyses des réponses immunitaires au niveau des hémocytes par cytométrie en flux ont été réalisées à partir du prélèvement d'hémolymphe (hémocytes totaux (THC), taille des hémocytes et complexité, taux de phagocytose (% de cellules actives), capacité de phagocytose (nombre de billes par cellule active) et concentration en cellules actives). Des échantillonnages complémentaires de sédiments de surface ont été réalisés pour les dernières saisons (A2, H2 et P3), mais sont encore en cours d'analyse.

4.1.1.2 Résultats et discussion

Compte-tenu du grand nombre d'analyses que représentent ces échantillonnages *in situ*, seules deux saisons actuellement disponibles pour l'ensemble des paramètres seront présentées ici (A1 et P2) concernant les analyses multiéléments réalisées à l'échelle de l'organisme entier des palourdes, les analyses de 4 métaux (cadmium, cuivre, zinc et mercure) menées au niveau des organes afin d'approcher l'organotropisme de ces éléments, ainsi que la réponse des métallothionéines associée.

- Analyses à l'échelle de l'organisme entier des palourdes

Les analyses multiéléments réalisées au niveau des organismes entiers des palourdes ont concerné 6 pools de 2 individus par station. Les métaux sont présentés en fonction de leur comportement d'accumulation similaire.

- Cadmium (Cd) et arsenic (As) :

Le Cd est un métal toxique bien connu, qui s'accumule et exerce son action toxique principalement au niveau des reins (néphrotoxique) et du foie (hépatotoxique) des organismes aquatiques, en cas d'exposition chronique. Il est classé dans le groupe 1 (cancérogène certain pour l'homme) par le CIRC (Centre International de Recherche contre le Cancer). Il s'agit de plus d'un métal récemment

* Principal rédacteur

décrit comme perturbateur endocrinien chez le poisson (Pierron et al, 2008 ; Pierron et al, 2009). Enfin, il serait responsable d'une perturbation du métabolisme calcique chez la moule perlière (Frank and Gerstmann, 2007), en raison de sa capacité à entrer en compétition avec le Ca^{2+} au niveau des transporteurs membranaires de cet oligoélément, dû à un rayon atomique très proche de celui-ci (0,97 et 0,99 Å). L'As est un métalloïde essentiel aux organismes à très faible dose, mais qui peut se révéler toxique, voire très toxique à forte dose. Il s'agit d'un élément dont la spéciation chimique en solution est très complexe et dont la toxicité dépend fortement de sa nature chimique : l'arsenic inorganique est plus toxique que l'«arsenic organique ». Sa toxicité dépend de son degré d'oxydation : As(O), As(III), As(V). L'arsenic a été l'un des premiers composés chimiques reconnu comme cancérigène par le CIRC (groupe 1), l'US EPA (Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis ; classe A) et l'Union Européenne (4 substances en Catégorie 1). Chez les poissons, par exemple, les impacts sub-létaux induits par une exposition directe ou trophique à l'arsenic sont une réduction de la croissance, des anémies, une inflammation vésiculaire et des altérations du foie et des reins.

Pour ces deux éléments, quelle que soit la saison, les concentrations les plus faibles sont mesurées au niveau des stations les plus « océaniques » comparativement à toutes les autres stations, à savoir la station 1 à l'automne et les stations 1 et celle d'Arguin ajoutée comme station de référence, au printemps (**Figure 35**). Les concentrations mesurées augmentent ensuite entre l'automne et le printemps, avec deux stations qui présentent les valeurs les plus élevées, les stations 11 et 36, correspondant aux apports respectifs de la Leyre au sud-est et du Canal des Etangs au nord. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus dans le cadre de la thèse d'Ika Paul-Pont (2010) qui montraient des accumulations de Cd supérieures à Andernos (plus continental) par rapport à Arguin (plus océanique), laissant supposer des apports de ce métal au bassin d'Arcachon d'origine plutôt continentale (issus des activités du bassin versant). Ces concentrations restent néanmoins faibles, elles atteignent au maximum 0,7 µg/g (ps=poids sec) pour le Cd, alors que la médiane nationale mesurée dans les moules des côtes françaises par le ROCCH (Ifremer, 2008) se situe aux alentours de 0,7 µg/g, et au maximum 70 µg/g pour l'As.

- Nickel (Ni) et chrome (Cr) :

Le Ni fait partie des polluants prioritaires pour la DCE, alors que très peu de données sont disponibles dans la littérature quant à ses capacités d'accumulation par les organismes aquatiques et ses effets potentiellement toxiques (Dranguet, 2012). Il s'agit d'un métal essentiel aux organismes, dont la concentration peut être régulée dans les tissus. Ce métal est considéré comme très allergisant pour l'homme et potentiellement cancérogène (Krob et al, 2004 ; INRS, 2009). Le Cr est un métal couramment associé au Ni, par son utilisation, notamment dans les batteries et accumulateurs. Il est considéré comme un oligoélément, mais il peut devenir toxique à fortes doses, notamment sous son état d'oxydation +6 (CrVI), sous lequel il s'avère être extrêmement toxique par son pouvoir oxydant puissant.

Les concentrations mesurées dans les palourdes du bassin d'Arcachon présentent des évolutions similaires pour ces deux métaux, en fonction des sites et des saisons (**Figure 35**). Les valeurs les plus faibles sont mesurées à l'automne, avec des valeurs plus élevées sur la Station 11. Au printemps, les concentrations augmentent sur tous les sites, mais les valeurs les plus élevées sont relevées au niveau des stations 1 et 29-36, selon un semblant de gradient sud-ouest/nord-est. Les valeurs maximales atteintes sont autour de 100 et 150 µg/g respectivement pour le Ni et le Cr à cette saison. Ces valeurs apparaissent très élevées comparées à la médiane nationale qui est de 1,4 µg/g dans les moules pour le Ni et de 0,8 µg/g dans les huîtres pour le Cr : l'effet « espèce » peut en partie expliquer ces résultats. Ces valeurs s'approchent néanmoins de celles mesurées dans les bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea* mis en cage autour de l'agglomération de Bordeaux pendant des périodes de 3 mois (données personnelles), et qui apparaît comme un site pollué. Une source de contamination plutôt interne au bassin d'Arcachon peut être suggérée ici, mais dont l'origine reste à déterminer. Ces données restent néanmoins à confirmer lors de l'analyse complète des accumulations mesurées sur les deux années de prélèvement.

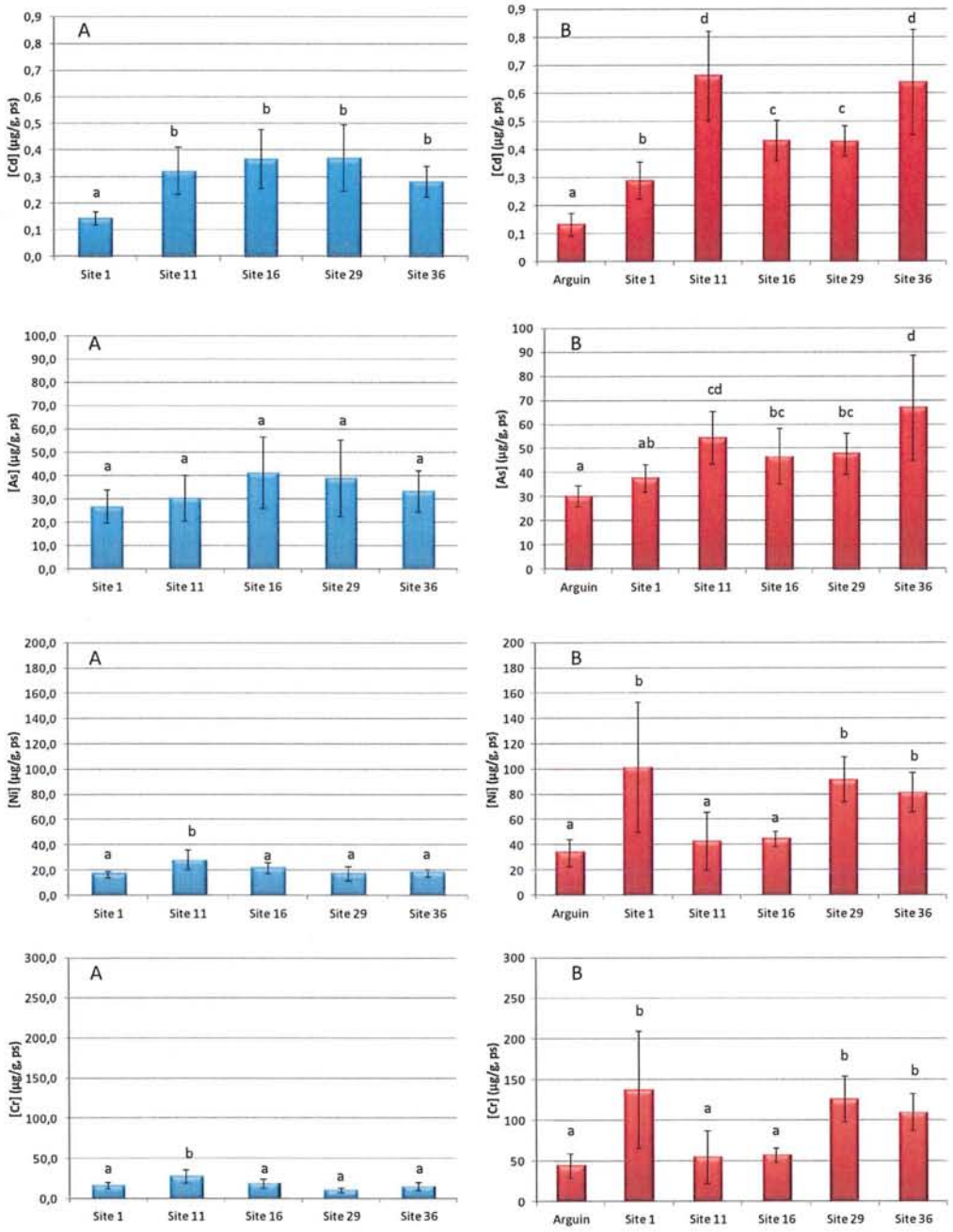


Figure 35 : Bioaccumulation métallique de Cd, As, Ni et Cr exprimée en µg/g de poids sec (moyenne ± écart-type, n = 6) de tissus mous entiers de palourdes et mesurée au cours des saisons A1 (automne 2010 - A) et P2 (printemps 2011 –B). Les lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil α = 0,05.

- Aluminium (Al) et manganèse (Mn) :

L'Al est reconnu pour ses effets neurotoxiques. Il est très toxique pour les organismes aquatiques sous sa forme d'ion libre Al^{3+}, forme qui est libérée des sédiments sous forme dissoute dans l'eau en conditions de pH relativement basses, autour de 5,5. Le Mn est un métal essentiel pour les organismes, mais il peut devenir toxique à fortes doses. Il agit comme cofacteur de nombreuses enzymes (glycosyltransferase, pyruvate carboxylase, …) intervenant dans des processus métaboliques variés. Il est particulièrement présent dans le métabolisme des hydrates de carbone et la synthèse des mucopolysaccharides. C'est aussi un métal essentiel pour la synthèse d'enzymes (superoxyde dismutase mitochondriale : Mn-SOD) participant à la lutte contre le stress oxydant et qui préviennent des dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO), dont les radicaux libres. Les effets écotoxiques du manganèse apparaissent au-dessus de certains seuils et sont mal connus.

A l'automne, les concentrations les plus faibles d'Al et de Mn sont relevées au niveau de la station 36, face au Canal des Etangs au nord (**Figure 36**), alors que les concentrations les plus élevées sont mesurées autour des stations 11, 16 et 29, pouvant caractériser des apports provenant du bassin versant. Au printemps, les profils d'accumulation de ces deux éléments changent en fonction des stations. Pour l'Al, les concentrations les plus basses sont mesurées au niveau d'Arguin et de la station 1, alors que les plus élevées sont observées au niveau des sites 29 et 36, correspondant à des apports probablement originaires du Canal des Etangs. Concernant le Mn, les accumulations augmentent lors du printemps et sont marquées par des valeurs plus élevées au niveau des sites 29 et 36 comme pour l'Al, mais également au niveau de la station 1, avec néanmoins de fortes variabilités dans les mesures au niveau de ce site. Une provenance du fond du bassin semble la plus probable. Ces éléments n'étant pas suivis par le ROCCH, il est difficile à ce stade de pouvoir situer le niveau de ces valeurs obtenues dans les palourdes du bassin d'Arcachon.

- Cuivre (Cu) et cobalt (Co) :

Le Cu est un élément essentiel dont la concentration est fortement régulée par les organismes. Il intervient comme cofacteur de nombreuses enzymes cellulaires, et peut se révéler toxique à fortes doses, en raison de son fort pouvoir oxydant. A dose infime, le Co est un oligoélément (présent dans la vitamine B 12, et utilisé contre l'anémie, car favorisant les globules rouges). Sa toxicité est cependant supposée depuis longtemps. Il peut agir en synergie avec d'autres métaux qui l'accompagnent souvent dans la nature (arsenic, et de façon moindre cuivre, nickel, manganèse). La toxicité du Co varie selon les organismes, les individus, le contexte et l'espèce chimique considérée. Sa toxicité et sa mobilité pour les plantes et les animaux augmentent avec l'acidité du sol ou des eaux.

Pour ces deux éléments essentiels, les concentrations mesurées dans les palourdes à l'automne sont identiques dans toutes les stations. Au printemps, ces concentrations évoluent peu (métaux régulés) mais montrent néanmoins des valeurs légèrement plus élevées au niveau de la station 36 pour le Co. Les valeurs maximales atteintes en Cu (autour de 11 µg/g) restent proches des médianes nationales (6,2 µg/g pour les moules). Pour le Co, les valeurs maximales atteintes (autour de 5 µg/g), apparaissent comme légèrement supérieures aux données moyennes mesurées dans la chair de moules du Devon (Angleterre) allant de 3 à 3,5 $\mu g.g^{-1}$ (poids sec) en hiver et de 0,8 à 1,2 $\mu g.g^{-1}$ en été.

- Plomb (Pb) :

Le Pb est un métal toxique, mutagène et reprotoxique, non essentiel au fonctionnement de l'organisme. Il a été classé comme potentiellement cancérigène en 1980, classé dans le groupe 2B (cancérogène possible pour l'homme) par le CIRC, puis comme probablement cancérigène (groupe 2A) pour l'homme et l'animal en 2004. Le plomb est un contaminant de l'environnement, toxique et écotoxique dès les faibles doses. Les maladies et symptômes qu'il provoque chez l'homme ou l'animal sont regroupées sous le nom de «saturnisme » (anémie, troubles digestifs à faibles doses, puis troubles neuro-moteurs, stérilité, cancers, hypertension à plus fortes doses). Pour la première saison, les concentrations les plus élevées sont mesurées au niveau de la station 36, avec des valeurs autour de 2 µg/g, signant probablement un apport provenant du Canal des Etangs (**Figure 37**). Cette tendance est accentuée au printemps avec des valeurs dépassant parfois les 3 µg/g, et montrant un gradient net entre les stations les plus océaniques (Arguin et station 1) et le fond du bassin. Ces valeurs dépassent la médiane nationale de celles mesurées dans les moules (1,4 µg/g). Il s'agit d'un élément à surveiller pour les palourdes situées en fond de bassin et à proximité du Canal des Etangs.

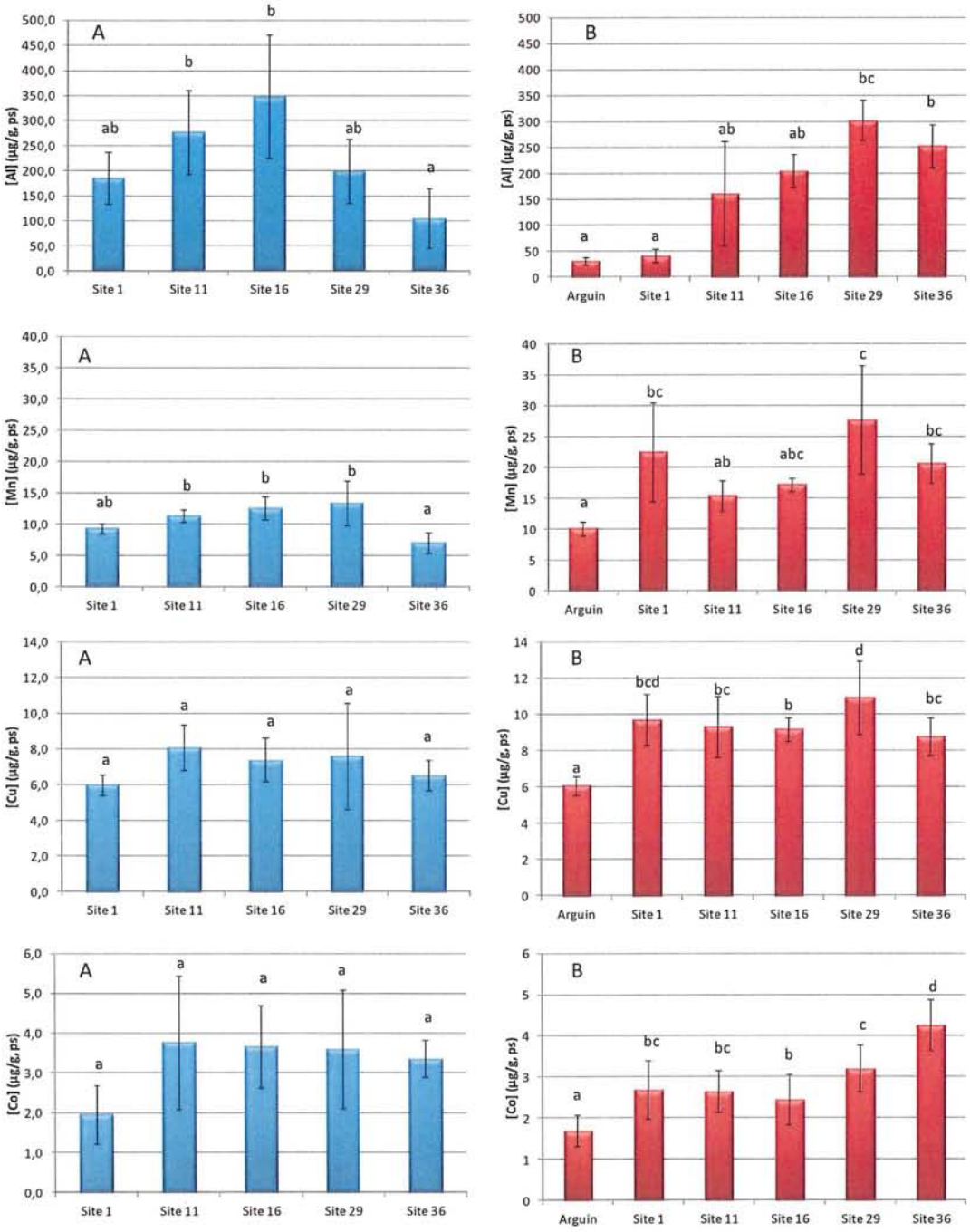


Figure 36 : Bioaccumulation métallique de Al, Mn, Cu et Co exprimée en µg/g de poids sec (moyenne ± écart-type, n = 6) de tissus mous entiers de palourdes et mesurée au cours des saisons A1 (automne 2010 - A) et P2 (printemps 2011 –B). Les lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil α = 0,05.

- Argent (Ag) :

L'Ag est très toxique pour les bactéries, les champignons et de nombreux organismes à sang froid. Les larves de mollusques y sont très sensibles, alors que les adultes peuvent le bioaccumuler en quantité importante. Les organismes marins filtreurs peuvent en accumuler des doses préoccupantes (par exemple, 0,01 à 58 $mg \cdot kg^{-1}$ de chair, en poids sec, relevé dans des moules aux États-Unis, ou 1,8 à 11 $mg \cdot kg^{-1}$ poids sec dans des huitres). L'argent pourrait ainsi contribuer à certains déséquilibres écologiques et au phénomène de zones marines mortes qui caractérise certaines baies. Pour cet élément, malgré des variabilités importantes dans les analyses, il semble se dégager un gradient de concentrations, avec les valeurs les plus élevées mesurées au niveau des stations les plus océaniques,

comparativement à celles de fond de bassin (**Figure 37**). La biodisponibilité de cet élément pour les palourdes semble être liée au gradient de salinité. Les valeurs mesurées restent faibles, autour de 3 µg/g au maximum, alors que la médiane nationale mesurée dans les huîtres se situe autour de 7 µg/g.

- **Zinc (Zn)** :

Le Zn est un oligoélément dont la concentration est fortement régulée par les organismes. Il intervient comme cofacteur de nombreuses enzymes cellulaires, et peut se révéler toxique à fortes doses. Il jouerait plutôt un rôle anti-oxydant, parfois protecteur vis-à-vis de la toxicité du Cd en cas de co-exposition à ces deux métaux (Marie et al, 2006a ; Achard-Joris et al, 2006b). Néanmoins, il peut se révéler extrêmement toxique pour certaines espèces, et notamment pour la moule zébrée (Marie et al, 2006a ; Marie et al, 2006b). Les concentrations de cet élément essentiel, régulées par les organismes, ne montrent pas d'évolution entre les sites et les saisons, avec des valeurs situées autour de 80 µg/g (**Figure 37**).

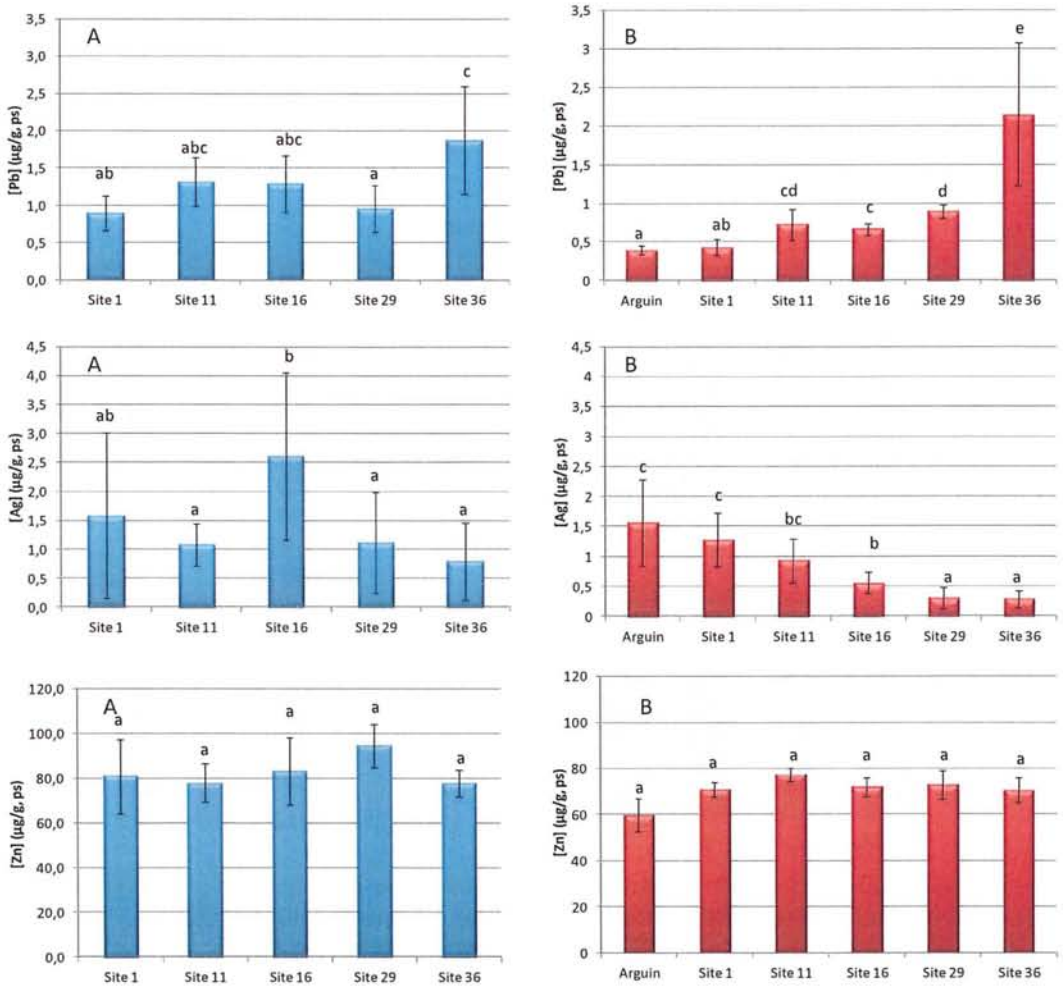


Figure 37 : Bioaccumulation métallique de Pb, Ag et Zn exprimée en µg/g de poids sec (moyenne ± écart-type, n = 6) de tissus mous entiers de palourdes et mesurée au cours des saisons A1 (automne 2010 - A) et P2 (printemps 2011 –B). Les lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil α = 0,05.

Afin de synthétiser toutes ces données d'accumulation métallique mesurées à l'échelle des corps mous des palourdes pour les saisons A1 et P2, une analyse en composante principale a été réalisée (**Figure 38**). Le cercle des corrélations indique de très fortes corrélations entre Ni et Cr,

proches également de Mn, mais également entre Cd et As, et Al, Co, Pb. Les Axes 1 et 2 expliquent au total 58,9% de la variabilité des données. Les observations sont très dépendantes de la saison. L'automne discrimine peu les stations entre elles et ne semble influencé principalement que par l'Ag et le Zn. Au contraire, au printemps, les observations discriminent très nettement les stations 1, 29 et 36, influencées principalement par Ni et Cr pour la première, Mn et Cu pour la station 29, et Cd, As, Co et Pb pour le site 36. Les stations 11 et 16 restent peu influencées par les apports métalliques, hormis le Cd et dans une moindre mesure l'As.

Ainsi, d'importantes variations spatiales et temporelles des accumulations métalliques sont observées dans les palourdes du bassin d'Arcachon, qu'il conviendra de mieux caractériser lors d'analyses interannuelles.

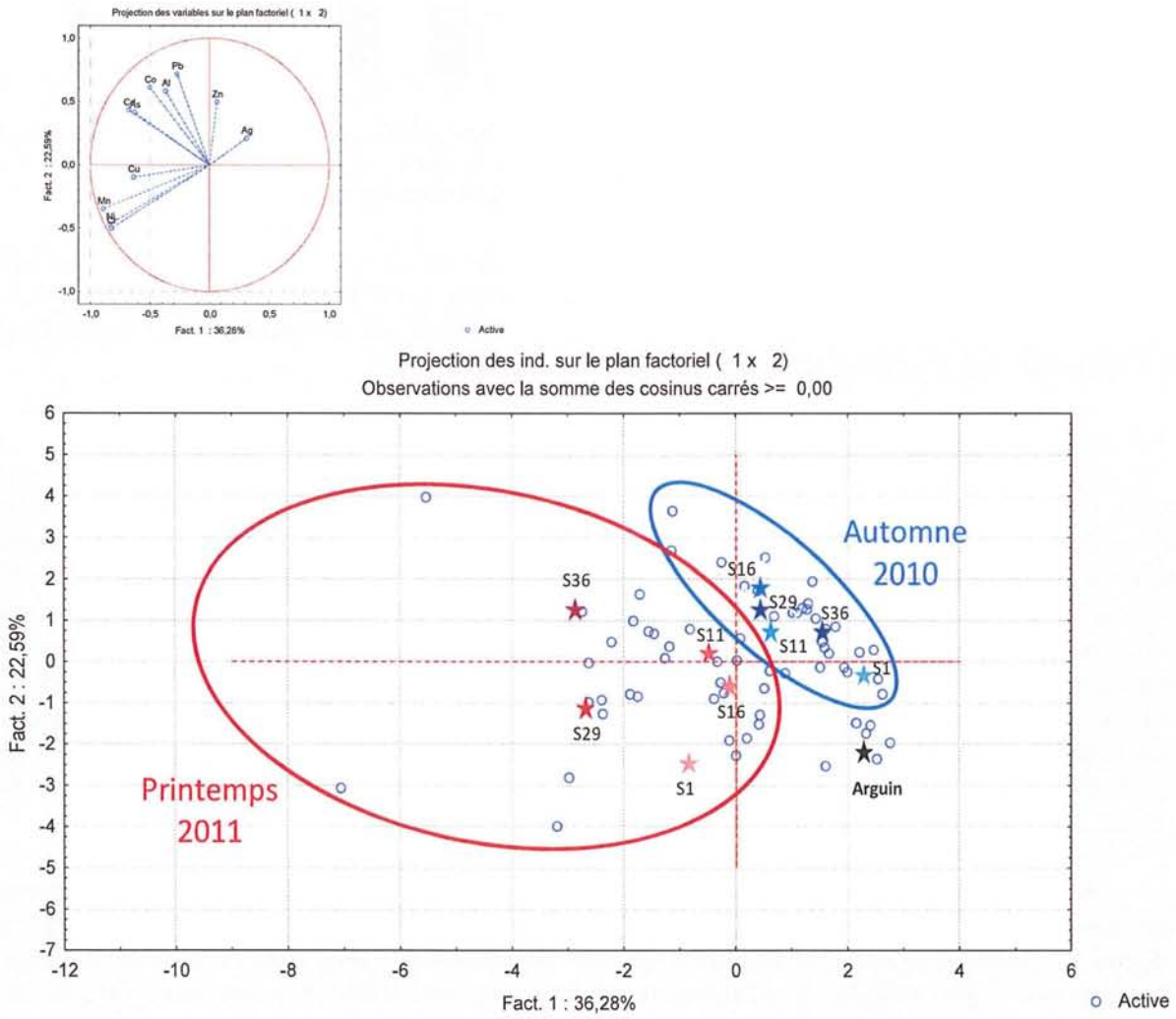


Figure 38 : Analyse en composantes principales des accumulations métalliques des 11 éléments mesurées (Cd, As, Ni, Cr, Al, Mn, Cu, Co, Pb, Ag, Zn) dans les palourdes au bassin d'Arcachon, aux saisons A1 (automne 2010) et P2 (printemps 2011).

A la suite de ces accumulations métalliques mesurées à l'échelle de l'organisme entier, les concentrations de métallothionéines (protéines de détoxication des métaux) ont été analysées de façon à observer une réponse physiologique adaptative à cette évolution des concentrations métalliques (**Figure 39**). Les résultats montrent des valeurs relativement faibles et homogènes à l'automne, correspondant aux faibles accumulations métalliques mesurées à cette saison. Au contraire, au printemps, les valeurs augmentent sur toutes les stations, probablement en lien avec les processus reproductifs et une activité nutritionnelle plus intense, avec des valeurs néanmoins maximales

observées sur les sites 11 et 36, principalement sous l'influence des accumulations de Cd, As et Pb révélées sur ces stations. Le Cd et le Pb sont en effet des inducteurs reconnus de la synthèse des métallothionéines. Ces résultats démontrent que les palourdes ont su mettre en place des mécanismes d'adaptation à la contamination métallique en produisant ces protéines de détoxication.

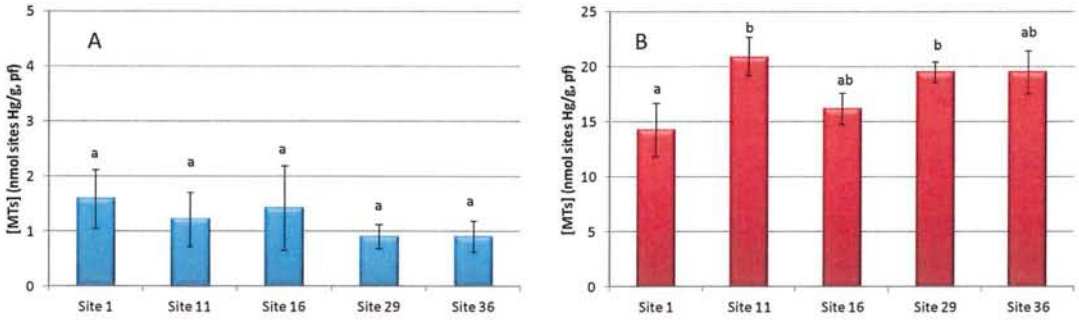


Figure 39 : Concentrations de métallothionéines (MTs) exprimées en nmol sites Hg/g, poids frais (moyenne ± ESM, n = 5) de tissus mous entiers de palourdes et mesurées au cours des saisons A1 (automne 2010 - A) et P2 (printemps 2011 –B). Les lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil α = 0,05.

L'ensemble de ces résultats, encore partiels, donne un aperçu très général des accumulations métalliques et de la réponse des métallothionéines (MTs) à l'échelle des organismes entiers des palourdes du bassin d'Arcachon. Ces résultats ont été complétés par des analyses de l'organotropisme de 4 éléments : Cd, Cu, Zn et Hg, ainsi que de celui des MTs.

- Analyses à l'échelle des organes des palourdes

Concernant le Cd, les accumulations les plus élevées sont mesurées au niveau du reste des tissus, comparativement aux branchies et à la glande digestive, et ceci de façon très marquée à la saison P2 (**Figure 40**). A cette saison, contrairement à ce qui a été observé au niveau de l'organisme entier, les accumulations les plus marquées sont observées pour le site 11 et également le site 1 dans cet organe, avec une grande variabilité mesurée au niveau de ce site. Ces résultats montrent des différences en termes de répartition métallique au sein des différents tissus et révèlent des gradients de contamination différents d'un site à l'autre en fonction de l'organe considéré. L'analyse à l'échelle des organes permet ainsi de révéler les tissus potentiellement les plus vulnérables à la contamination métallique considérée, mais également de révéler la voie principale de contamination, par voie directe au travers de concentrations élevées dans les branchies, ou au contraire par voie trophique marquée par des accumulations plus importantes dans les glandes digestives.

Le **mercure (Hg)** est un métal très dangereux, par ses propriétés neurotoxiques et reprotoxiques sous ses formes organométalliques (monométhylmercure et diméthylmercure), de sels (calomel, cinabre etc) et sous sa forme liquide en elle-même (Hg^0). Il cause une maladie dite «hydrargisme » (ou Maladie de Minamata), et est soupçonné d'être une des causes de la maladie d'Alzheimer et autres maladies chroniques. Dans les palourdes, les accumulations de Hg les plus élevées sont plutôt mesurées dans les glandes digestives, ce qui favorise l'hypothèse d'une accumulation par voie trophique de cet élément. Les concentrations les plus élevées sont observées au niveau des stations 11 et 16 principalement, mais également 36, en relation avec les sites les plus en fond de bassin. Ces résultats suggèrent des apports plutôt continentaux de ce métal, mais les valeurs restent très faibles, au maximum de 800 ng/g, ps, proches de la médiane nationale pour les moules (1100 ng/g, ps).

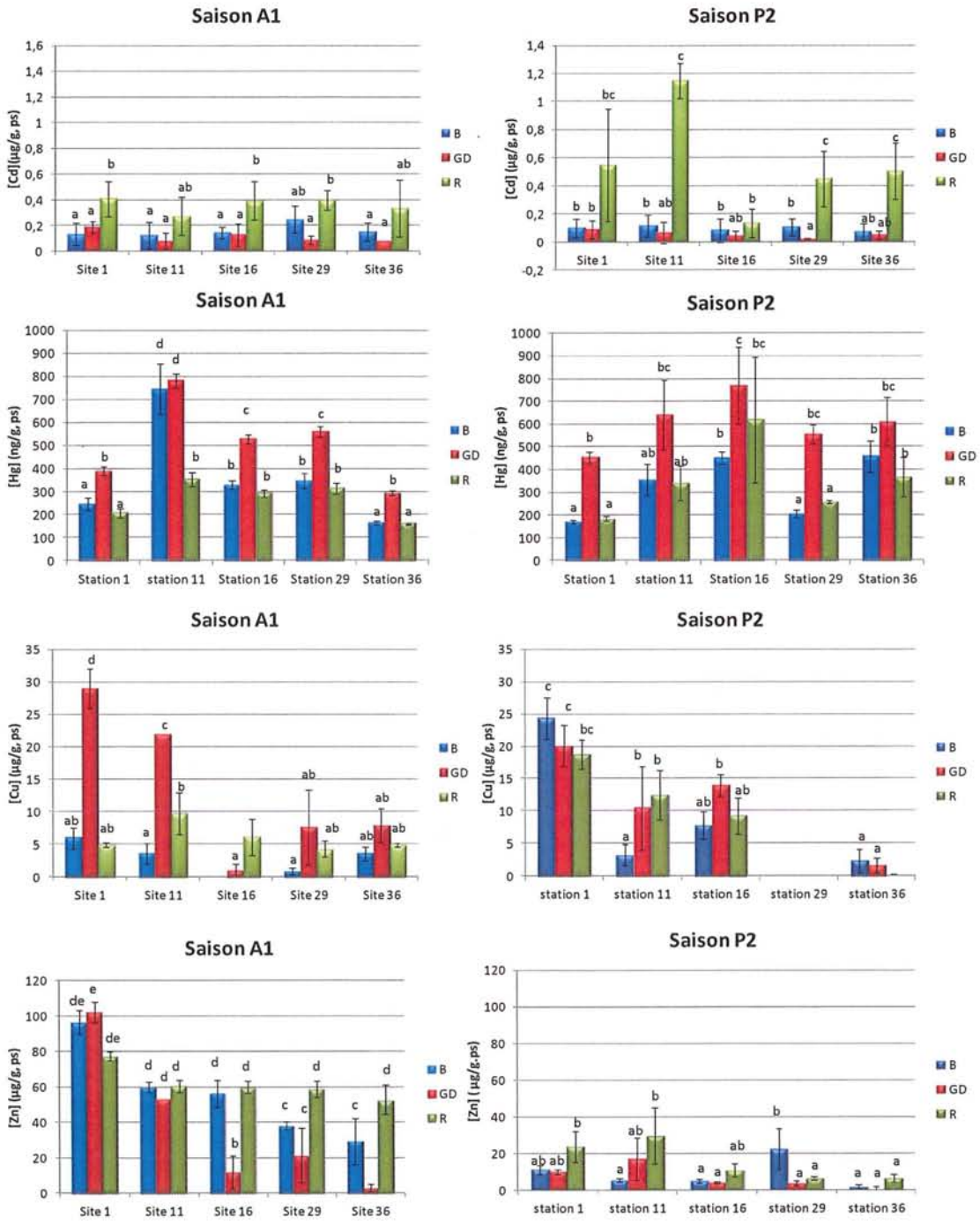


Figure 40 : Bioaccumulation de Cd, Hg, Cu et Zn au niveau des organes (branchies, glande digestive et reste des tissus) des palourdes prélevées à la saison A1 (automne 2010) et P2 (printemps 2011) et exprimée en µg/g de poids sec (moyenne ± écart-type, n = 5).

Concernant le **Cu** et le **Zn**, des différences apparaissent en fonction des organes considérés dans les accumulations métalliques mesurées au niveau des différentes stations. En effet, alors que les restes de tissus ne révèlent pas de différences significatives entre stations (comme observé au niveau de l'organisme entier), nous observons des différences très marquées au niveau des branchies et des glandes digestives aussi bien pour le Cu que pour le Zn et en particulier à la saison P2, ce qui souligne la pertinence d'analyser les résultats à l'échelle de l'organe. Les concentrations les plus élevées sont ainsi mesurées au niveau de la station 1, avec un gradient de décroissance allant vers les stations les plus internes du bassin. Ces résultats semblent montrer d'une part une origine

dissoute de Cu et de Zn, mais également trophique des apports en ces éléments vers les palourdes en raison de concentrations relativement élevées dans les branchies et les glandes digestives, par rapport au reste des tissus.

La réponse des **métallothionéines** (protéines de détoxication des métaux et de réponse au stress oxydant) a également été mesurée aux deux saisons considérées (**Figure 41**). Globalement, nous ne constatons pas de différences de concentrations en MT au niveau du reste des tissus et des branchies à la saison A1. Par contre, nous pouvons noter une réponse supérieure de ces protéines au niveau de la station 1 par rapport à l'ensemble des autres stations. Cette réponse peut ainsi être majoritairement attribuée aux accumulations du Cu et de Zn observées précédemment au niveau de cette station dans les glandes digestives. A la saison P2, aucune différence significative entre les stations n'est observée au niveau de chacun des organes, alors qu'à l'échelle de l'organisme entier, des concentrations supérieures ont été mesurées au niveau des stations 11, 29 et 36. Ces résultats s'expliquent par des variations légères mais cumulées observées au niveau des glandes digestives et des restes des tissus au niveau de ces stations. Dans ce cas, la mesure de la réponse des MTs au niveau des organes masque un effet site observé à l'échelle de l'organisme entier. Cet effet est en partie lié aux augmentations très importantes des concentrations en ces protéines mesurées au printemps par rapport à l'automne, probablement en lien avec la reproduction mais également avec une activité nutritionnelle plus importante à cette saison.

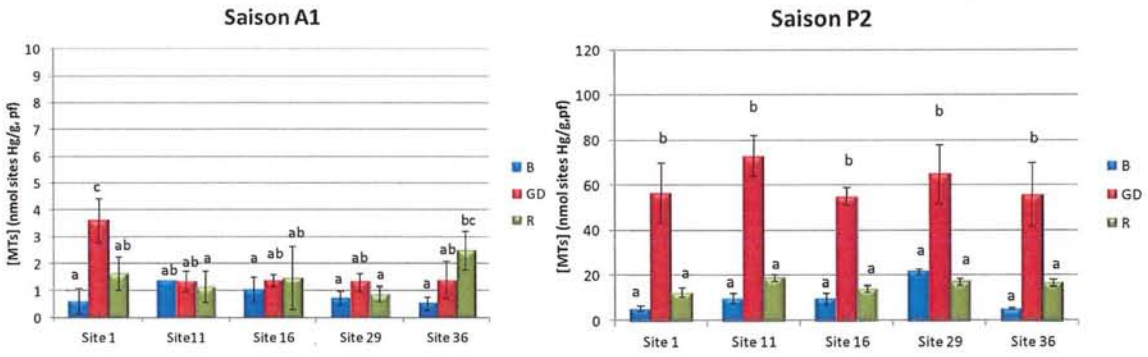


Figure 41 : Concentrations en métallothionéines (MT) mesurées dans les branchies, la glande digestive et le reste des tissus des palourdes prélevées aux différentes stations à l'automne 2010 (A1) et au printemps 2011 (P2). Les valeurs sont exprimées en nmol de sites Hg/g, pf (moyenne ± ESM, n = 5).

- Principales conclusions

Nous constatons des variations saisonnières et spatiales marquées des concentrations métalliques mesurées, associées à des organotropismes particuliers à chaque élément, en lien avec la voie de contamination majeure des organismes. Les accumulations les plus importantes sont quasi-systématiquement retrouvées au niveau des sites les plus en fond de bassin et associés au tributaires provenant du bassin versant amont, avec une particularité au niveau de la station 36, la plus au Nord, pour laquelle des accumulations privilégiées de Cd, As, Co, Pb, mais également Ni et Cr sont observées. Ces éléments métalliques sont ainsi à surveiller, notamment ceux considérés comme prioritaires au titre de la DCE : Cd, Pb et Ni. Ces accumulations restent néanmoins relativement faibles et déclenchent la production de protéines de détoxication pour lutter contre la présence de ces éléments, soulignant une adaptation des individus à cet environnement contaminé.

Parallèlement à toutes ces analyses, des mesures de réponses immunitaires ont été réalisées par le LEMAR de Brest, mais peu de réponses significatives en termes de nombre et complexité d'hémocytes ainsi qu'en termes de phagocytose sont observées entre les sites, quelle que soit la saison. Cesrésultats semblent montrer que les différences d'accumulations métalliques observées précédemment entre les sites impactent peu le système immunitaire des palourdes. A l'opposé, des variations dans les réponses immunitaires sont observées en fonction des saisons, mais ces réponses

ne sont pas vraiment discriminantes entre les saisons A1 et P2 considérées ici. A l'issue de l'ensemble des données obtenues sur les deux années considérées, des analyses multivariées seront réalisées avec l'ensemble de ces paramètres considérés de façon conjointe à l'accumulation métallique mais également à la réponse des métallothionéines, de façon à décrire de façon plus fine les effets spatiaux et saisonniers observés et les corrélations majeures se dégageant entre l'accumulation métallique et les réponses des palourdes.

4.1.2 Contamination toxinique

Concernant les efflorescences d'algues toxiques dans le bassin d'Arcachon, elles ont été répertoriées grâce au réseau de surveillance REPHY de l'Ifremer. Une veille sur les données du réseau Ifremer REPHY (flores partielles et totales) a été réalisée (résultats hebdomadaires pour Teychan et bimensuel pour Bouée 7, Jacquets et Comprian) de façon à pouvoir prélever les mollusques au plus proche d'événements d'efflorescences toxiques.
Une analyse fine et exhaustive des toxines présentes dans les palourdes a été conduite sur quelques échantillons représentatifs récoltés au printemps. Ces analyses avaient vocation à être des traceurs des efflorescences subies par ces palourdes. Sachant que l'élimination de ces toxines peut prendre de plusieurs jours à plusieurs semaines, ces toxines constituent d'intéressants traceurs de ces efflorescences sur d'assez longues périodes. Les analyses ont été réalisées par le laboratoire EMP/PHYC d'Ifremer Nantes pour les toxines lipophiles (y-compris les FAT), les toxines paralysantes (PSP) et les toxines amnésiantes (ASP).

4.1.2.1 Matériel et méthodes

En ce qui concerne les toxines hydrophiles, l'analyse et la quantification sont opérées par chromatographie liquide avec détection UV pour les ASP, et par chromatographie liquide et détection en fluorescence pour les PSP. Le dosage des toxines lipophiles est effectué par HPLC (Chromatographie liquide Haute Performance) couplée à un spectromètre de masse (4000Q Trap).

4.1.2.2 Résultats et discussion

En ce qui concerne les lipophiles, il n'a été constaté en 2010 que quelques analyses positives (> 160 µg / Kg) sur les moules de Grand banc et Banc d'Arguin sud en mai (toxines responsables : AO+DTXs). Des traces de spirolides (SPXs), soit entre 6 et 8 µg / Kg chair totale, avaient également été mises en évidence.
La situation est différente en 2011, soit des toxicités plus élevées et pendant plus longtemps, et seulement avec les lipophiles. Globalement, on observe : moules > coques > huîtres > palourdes pour AO+DTXs, et « tous coquillages » > palourdes pour les SPXs. Les résultats sont représentés pour différentes espèces de bivalves, de février à octobre 2011 (**Figure 42**).

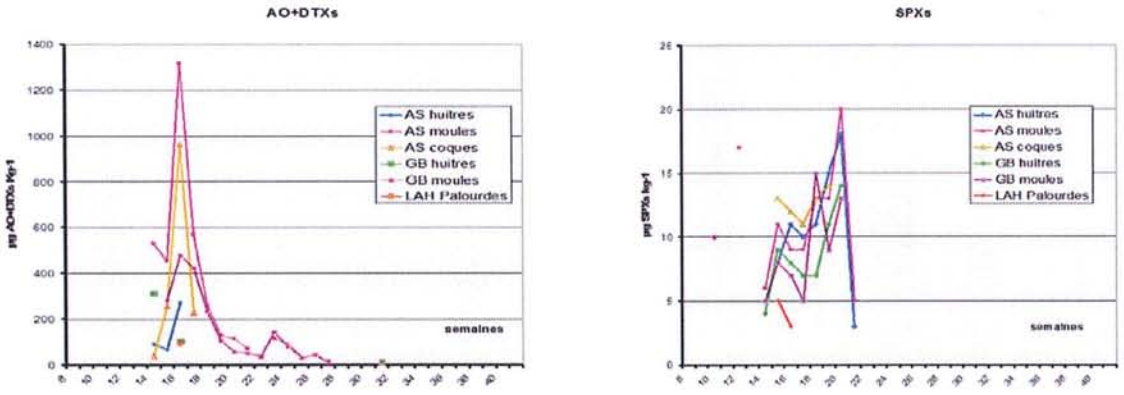


Figure 42 : Evolution des concentrations en toxines DSP (en µg eq. acide okadaique par kg, à gauche) et des spirolides (en µg SPXs par kg à droite) en 2011 pour plusieurs espèces de bivalves filtreurs et fouisseurs du bassin d'Arcachon et en différents sites. Limite d'interdiction de commercialisation : 160 µg eq. AO kg^{-1}.

Il apparaît nettement que pour le bassin d'Arcachon le risque sanitaire dominant est lié aux moules et aux toxines lipophiles, en particulier les dinophysistoxines. Le risque lié aux yessotoxines (YTXs) n'a concerné en 2011 que les moules. Les palourdes n'ont pas présenté d'accumulation de ces toxines, même sous forme de traces mais ont accumulé des spirolides (point REPHY le plus oriental, Figure 4) en 2010 et en 2011. Cela explique que les palourdes 'témoins' utilisées pour les expériences de contamination artificielle contenaient déjà des traces de spirolides.
La question était donc de savoir si la présence de ces toxines de type 'Fast Acting Toxins' (qui sont dérèglementées car sans effet aigu sur l'homme) peuvent affaiblir les palourdes ou agir en synergie avec d'autres contaminants de l'environnement (métaux traces, bactéries pathogènes opportunistes) de façon à rendre les fouisseurs moins résistants aux infestations parasitaires.

4.2 Effets de contaminations simples et croisées sur la palourde : approche expérimentale

Objectifs : au-delà des défis méthodologiques (culture des algues et maintien de leur toxicité), étudier la réponse des palourdes soumises à une contamination métallique et/ou à toxinique à des échelles allant du gène à l'individu.

4.2.1 Impact des contaminants métalliques

4.2.1.1 Expérience préliminaire

Une expérience de contamination préliminaire a été menée de façon à choisir le niveau d'exposition en Cd qui sera appliqué pour les expériences « multistress » (Louis dit Trieau, 2010). Le choix de ce métal a été guidé par les mesures de concentrations réalisées dans les tissus de palourdes qui apparaissent significativement supérieures dans les zones internes du bassin d'Arcachon comparativement à Arguin (Paul-Pont, 2010). Un lot de palourdes a été exposé pendant 7 jours à 5 niveaux de contamination en Cd par voie directe : 0 µg/L ; 2 µg/L ; 6 µg/L ; 15 µg/L ; 30 µg/L, à une salinité de 30‰. Au cours de l'expérience, les palourdes ont été nourries par l'ajout d'algues unicellulaires *Isochrysis galbana* (12.000 cellules/mL) deux fois par jour, à heure constante (9h et 18h), dans la colonne d'eau.

Après 7 jours d'exposition, les résultats ont montré des accumulations significatives de Cd dans les branchies et le reste du corps en fonction de la gamme de concentrations appliquée (**Figure 43**).

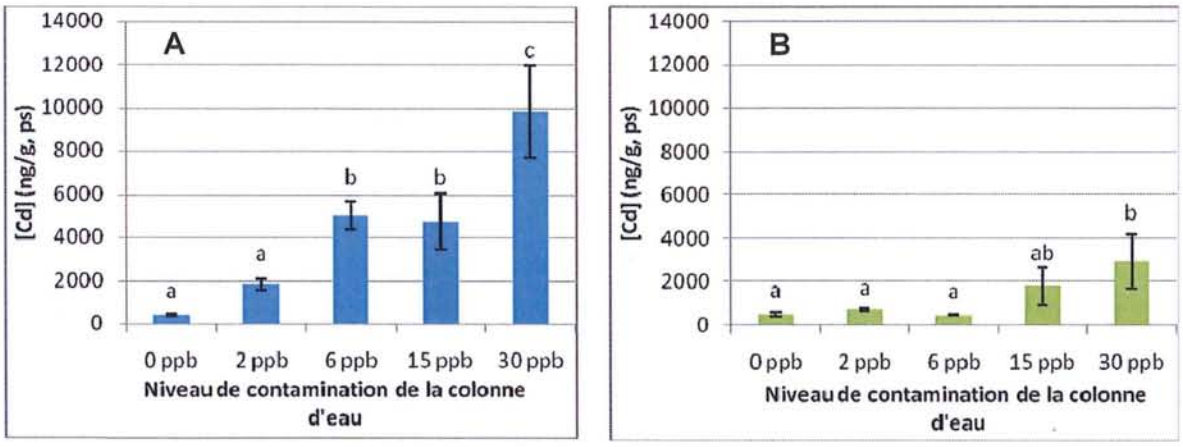


Figure 43 : Bioaccumulation du Cd dans les branchies (A) et le reste des tissus (B) des palourdes exposées au Cd à 0, 2, 6, 15 et 30µg/L pendant 7 jours. Les concentrations sont exprimées en ng/g de poids sec (moyenne ± SEM, n = 3). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA).

Parallèlement, une augmentation des concentrations moyennes en MT dans la glande digestive a été observée pour les niveaux de contamination 6 et 15 µg/L (**Figure 44**).

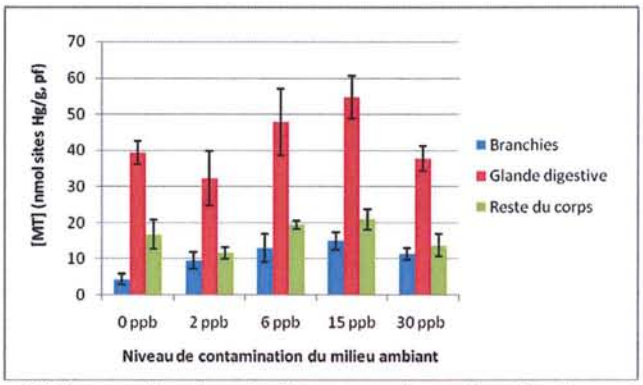


Figure 44 : Concentrations en MT mesurées dans les 3 organes des palourdes (branchies, glande digestive et reste des tissus) après 7 jours d'exposition à une gamme de concentrations en Cd (0, 2, 6, 15 et 30 µg/L) (moyennes ± sem, n = 3).

A 30 µg/L, les concentrations moyennes sont identiques à celles retrouvées chez les organismes témoins. Une augmentation des MT est observée dans les branchies, suivant un effet gamme, de 0 à 15 µg/L, avec à nouveau une baisse des concentrations à 30 µg/L.
Enfin les concentrations en malonyldialdéhyde (MDA), marqueur d'un stress oxydant, montrent une augmentation à partir de 6 µg/L (0.41±0.22 µmol/g de protéine) qui s'accentue à 15 µg/L (0.48±0.09 µmol/g de protéines). A 30µg/L, les concentrations mesurées ne sont pas différentes de celles rencontrées aux faibles expositions (0.24±0.01 µmol/g de protéines).

A l'issue de cette expérimentation, nous avons fixé le niveau de contamination en Cd à 15µg/L. Cette concentration permet d'obtenir des réponses marquées pour l'ensemble des paramètres mesurés et *a priori*, aucun effet toxique aigu pour les palourdes.

4.2.1.2 Réponses génétiques, immunitaires et comportementales des palourdes exposées au cadmium (15µg/L)

Suite à l'expérience préliminaire, des palourdes, naturellement infestées par *Perkinsus,* ont subi une période de contamination au Cd (7 jours, [Cd]=15µg/L) suivie d'une phase de décontamination (7 jours, [Cd]=0). En plus des différents paramètres analysés, une approche comportementale a été appréhendée (Rocher, 2011).

- Méthodologie

Quatre-vingt palourdes naturellement infestées par *Perkinsus olseni,* prélevées station 16 en avril 2011, ont été réparties dans 4 unités expérimentales (UE) de 17L (20 palourdes par UE, 6 cm de sédiment au fond de chaque UE) alimentées en continu en eau de mer (salinité = 32±1‰, T=15±0.1°C, pH=7.89±0.06, débit = 20 ml/min) et en algues unicellulaires *Heterocapsa triquetra* (solution mère à 20.10^3 cellules/mL, débit = 2mL/min). Dans chaque UE, 8 palourdes ont été équipées avec des électrodes pour étudier leur comportement en valvométrie (**Figure 45**). Après une période d'acclimatation de 7 jours (T0), les palourdes de 2 UE ont été exposées à une contamination au Cd à 15 µg/L pendant 7 jours (T7 ; exposition en continu : solution mère de Cd= 165 µg/L ; débit = 5mL/min). S'ensuit une période de 7 jours de décontamination (T14 ; [Cd] = 0 pour toutes les UE). Des palourdes ont été prélevées à T0 (4/UE), T7 et T14 (8/UE), disséquées (branchies, glande digestive, reste du corps) puis analysées (concentration en Cd, MT, réponses immunitaires, réponses génétiques, abondance parasitaire, comportement).

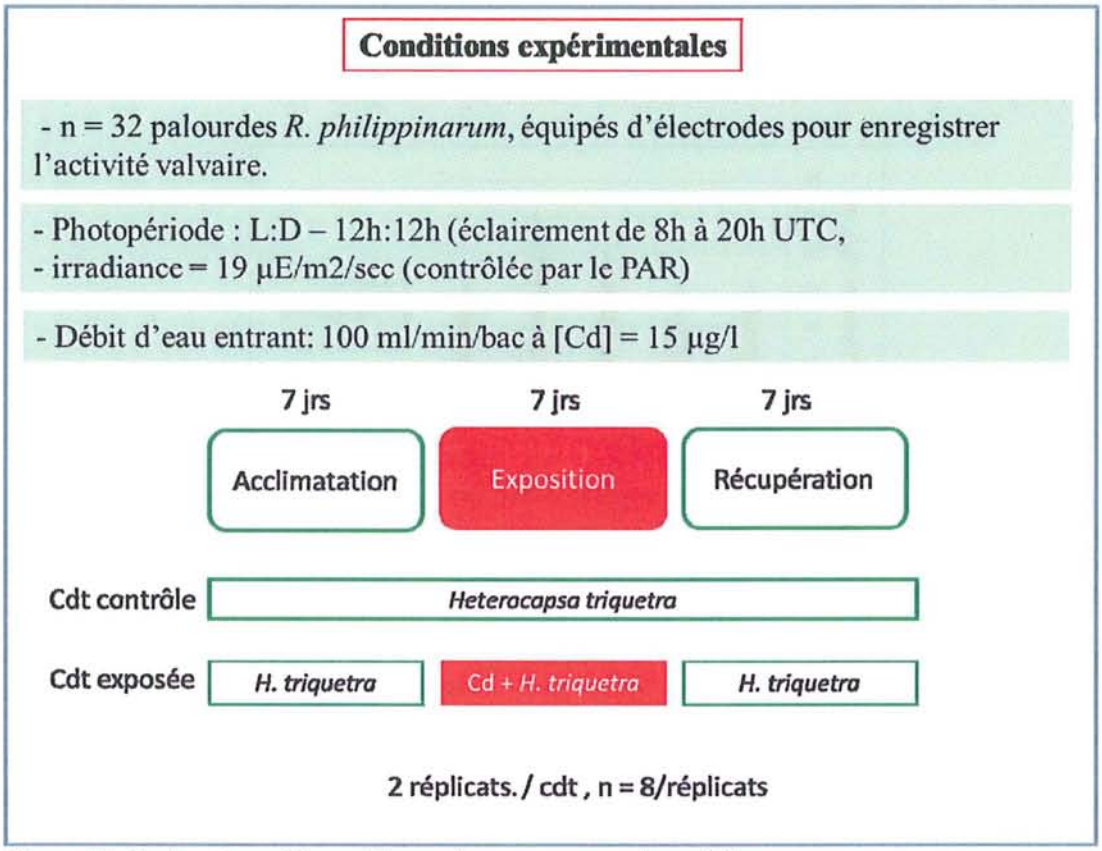


Figure 45 : Protocole expérimental pour les mesures en valvométrie

- Résultats et discussion :
  - *Réponse comportementale*

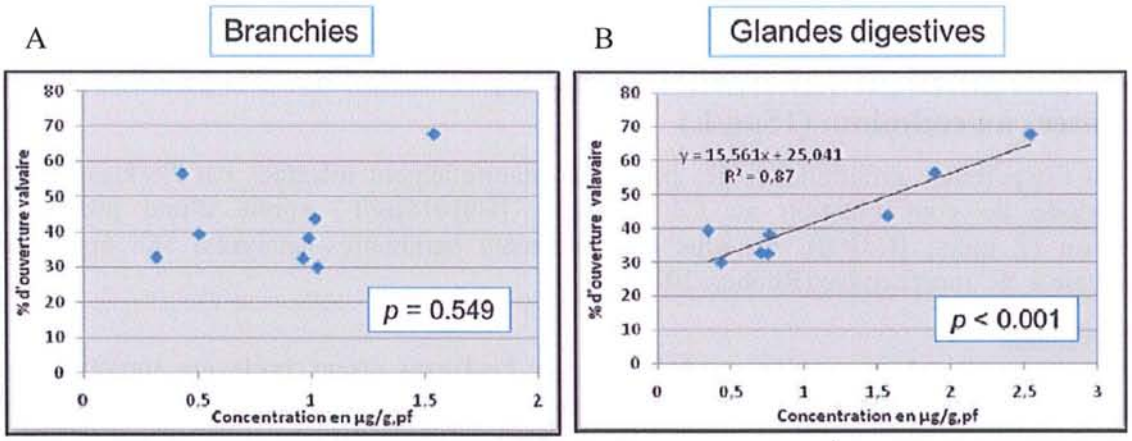


Figure 46 : Relation individuelle entre la durée d'ouverture valvaire pendant l'exposition au Cd et l'accumulation du métal dans les branchies (A) et la glande digestive (B). n=8. *p*-value = 0.05.

Une corrélation entre la bioaccumulation du Cd dans la glande digestive et le comportement valvaire est observée, mais pas entre comportement valvaire et bioaccumulation de Cd dans les branchies (**Figure 46**). Ceci s'explique par le fait que la voie de contamination du Cd se fait par voie trophique (le Cd est adsorbé sur les algues *H. triquetra*) dont l'organe cible est la glande digestive et non par voie dissoute (voie directe) dont l'organe cible est la branchie.

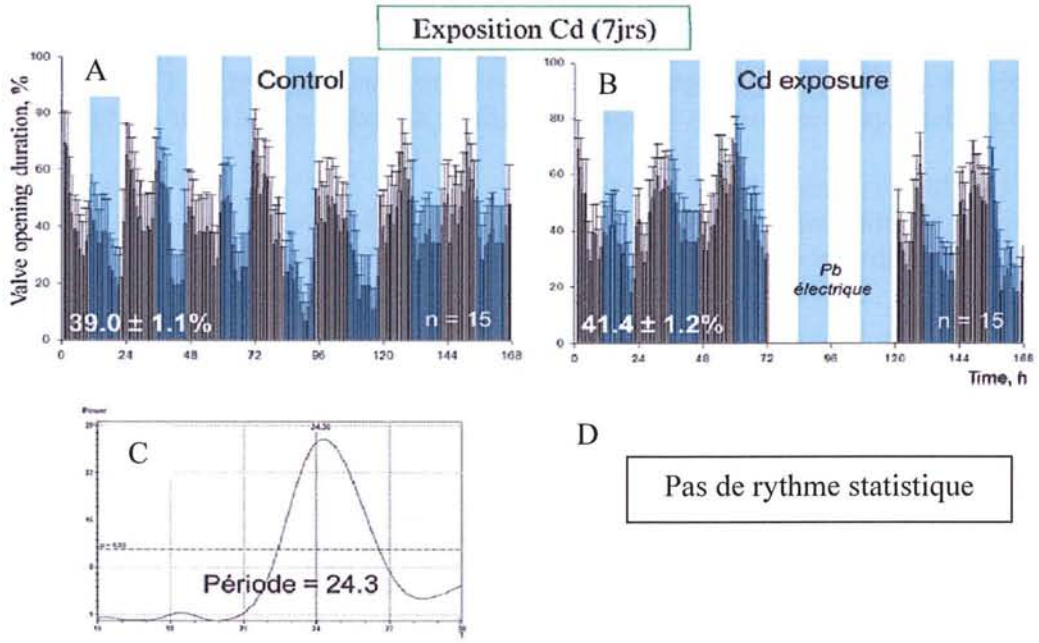


Figure 47 : Durée d'ouverture horaire moyenne (n =15 ind.) chez les animaux contrôles (A) et exposés au Cd (B) pendant 7 jours. En blanc le % moyen d'ouverture pendant les 7 jours. Pour la condition exposée, il y a eu 2 jours de problème électrique avec le valvomètre. C. Analyse spectrale (periodogramme de Lomb et Scargle) mettant en évidence une période statistique d'activité valvaire, non présente en D.

Il n'y a pas de différence statistique du comportement valvaire en terme de durée d'ouverture, d'amplitude valvaire et de microfermetures entre les animaux contaminés à 15 µg/l de Cd et les témoins (**Figure 47**). Par contre, le rythme circadien est perturbé avec un rythme diurne circadien qui disparait chez les animaux exposés au Cd.

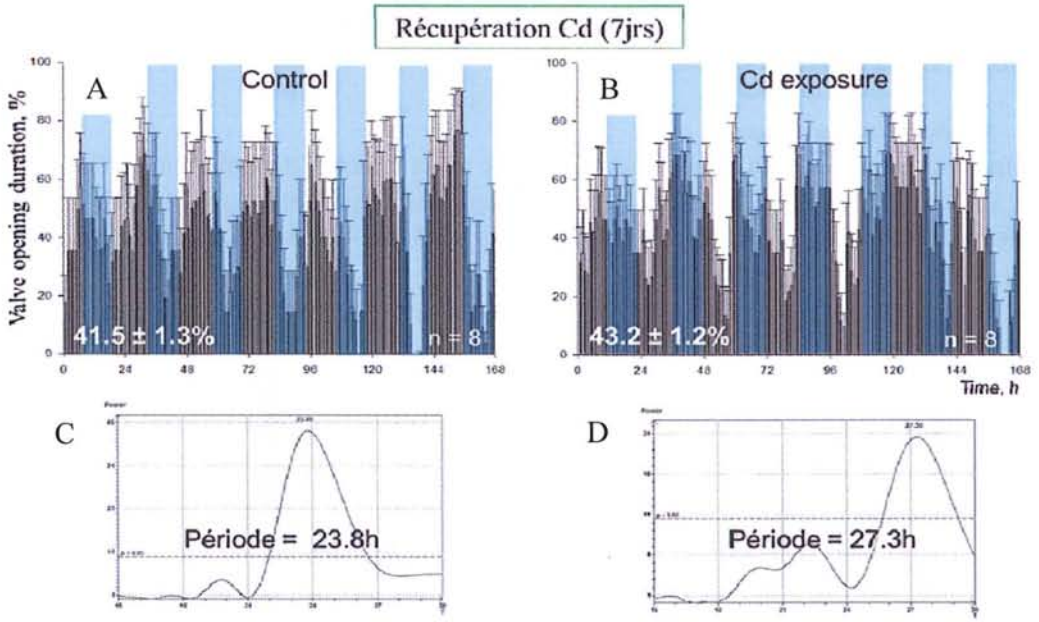


Figure 48 : Durée d'ouverture horaire moyenne (n =8 ind.) chez les animaux contrôles (A) et exposés au Cd (B) pendant les 7 jours de la phase de récupération. En blanc le % moyen d'ouverture pendant les 7 jours. Analyses spectrales (periodogramme de Lomb et Scargle) mettant en évidence une période statistique d'activité valvaire chez les témoins (C) et les animaux qui ont été exposés au Cd (D).

Après 7 jours de récupération, une période statistique d'un rythme circadien pour les 2 conditions est observée, mais chez les animaux qui ont été exposés la période du rythme s'est allongée, égale à 27.3 h au lieu d'une période proche de 24h (**Figure 48**). Nous voyons donc un effet du Cd sur le rythme des palourdes qui perdure après exposition. De plus, ce rythme a tendance à devenir nocturne et non plus diurne.

- *Bioaccumulation de Cd*

Après 7 jours de contamination au Cd, les concentrations sont significativement augmentées dans les branchies et la glande digestive chez les palourdes contaminées (**Figure 49**).

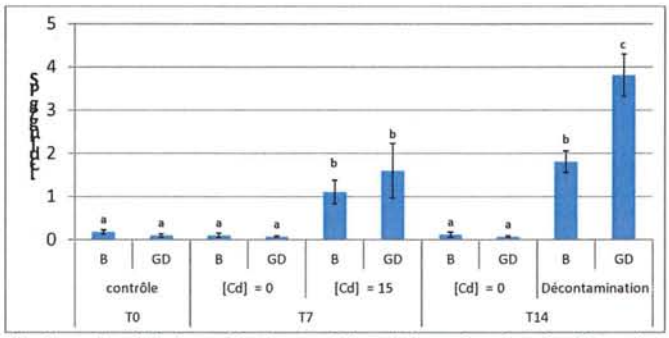


Figure 49 :Bioaccumulation du Cd dans les branchies (B) et la glande digestive (GD) des palourdes après 7 jours de contamination (T7) et 7 jours de décontamination (T14). Les lettres différentes indiquent les différences significatives.

Les concentrations en Cd dans les branchies et la glande digestive sont plus faibles que celles mesurées lors de l'étude préliminaire pour une exposition de 7 jours à 15 µg/L. Au cours de cette étude l'apport nutritif ponctuel a potentiellement provoqué des périodes d'hyperventilation des palourdes à la recherche de nourriture. Cette hyperventilation a pu favoriser l'accumulation du Cd dans les organes. A T14, à l'issue de la phase de décontamination, les concentrations en Cd restent significativement élevées dans les branchies et la glande digestive. Le Cd n'est pas éliminé par les organismes et continue de transiter vers l'organe accumulateur que constitue la glande digestive. Les concentrations plus élevées relevées dans la glande digestive comparativement aux branchies lors de la phase de contamination directe suggèrent un apport non négligeable de Cd via la voie trophique lors de la consommation des algues *H triquetra*.

- *Réponse protéique*

Les concentrations moyennes en MT dans les branchies et la glande digestive à T7 et T14 ne présentent pas de différences significatives quelles que soient les conditions expérimentales (**Figure 50**). Les concentrations en MT existantes semblent suffisantes pour faire face aux conditions de contamination.

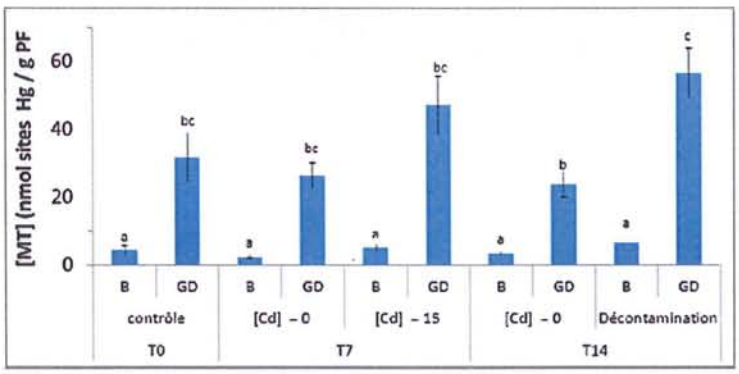


Figure 50 : Concentrations en MT dans les branchies (B) et la glande digestive (DG) après 7 jours de contamination (T7) et 7 jours de décontamination (T14). Les lettres différentes indiquent les différences significatives, comparaisons faites par organe.

- *Réponse génétique*

L'expression de plusieurs gènes d'intérêt a été suivie par Q-PCR comparativement à l'expression d'un gène de référence (*ßactine)*:

- le gène des métallothionéines (*mt*) impliqué dans la détoxication des métaux.
- le gène de la superoxyde dismutase mitochondriale (*sodMn*) et le gène de la catalase (*cat*) dont les enzymes ont une action contre le stress oxydatif.
- les gènes du métabolisme mitochondrial *coxI* et *12s* codant respectivement pour la sous unité 1 de la cytochrome C oxydase et le petit ARN ribosomique.

Les niveaux d'expression des gènes relatifs au métabolisme mitochondrial ne varient pas ce qui semble indiquer qu'aucune atteinte mitochondriale n'affecte les organismes.

Une augmentation significative de l'expression du gène de la catalase dans les branchies à T7 (×3) et dans la glande digestive à T14 (×2.5) des palourdes exposées au Cd suggère l'existence d'un stress oxydant. Cependant l'expression de *sod(Mn)* reste constante au cours de l'expérimentation ce qui laisse supposer que ce stress oxydant reste de faible amplitude.

L'expression du gène des MT montre une surexpression dans les branchies (×3) et la glande digestive (×5) des palourdes contaminées à T7 **(Figure 51).** A T14, les palourdes ayant été exposées au Cd montrent une répression du gène dans les branchies et une surexpression dans la glande digestive (×5). Ces surexpressions dans les conditions de contamination (T7) et décontamination (T14) mettent en évidence la sollicitation des systèmes de défenses au niveau génétique qui ne se répercute pas au niveau des protéines (pas d'augmentation des concentrations en MT, **Figure 50**). Il y a probablement un turn-over plus rapide de synthèse et dégradation de ces protéines en présence de cadmium.

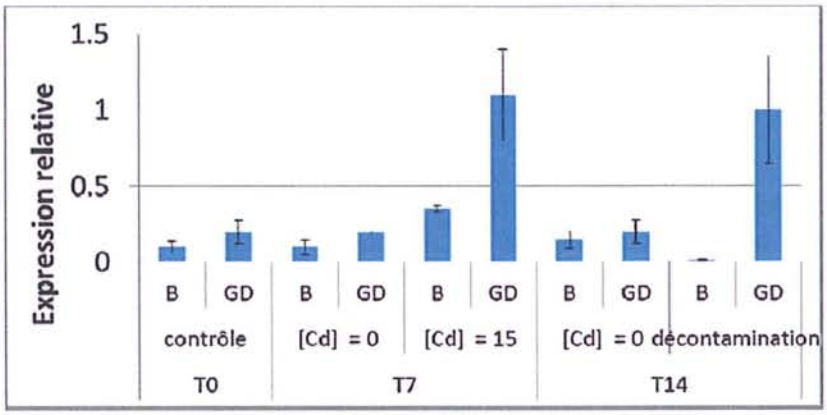


Figure 51 : Expression relative, par rapport au gène de référence (*ßactine*), du gène *mt* après 7 jours de contamination (T7) et 7 jours de décontamination (T14).

Les mécanismes de défenses cellulaires en réponse à une exposition au Cd ont été étudiés. Le nombre total d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe ou THC (Total Hemocyte Count) peut rendre compte d'une inflammation et son temps de réponse peut être très rapide. La capacité de phagocytose va également permettre d'évaluer la réponse immunitaire des palourdes exposées.
Les analyses montrent que l'exposition au Cd ne modifie pas ces mécanismes de défenses cellulaires (**Figures 52 à 54**). Dans leur étude, Paul-Pont *et al* (2010) ne relevaient pas de différences pour ces paramètres immunitaires chez des coques contaminées au Cd. En revanche, ils mettaient en évidence une augmentation de THC lorsque les coques subissaient un double stress Cd/parasite trématode (*Himasthla elongata*). Dans notre étude le nombre d'hémocytes des palourdes exposées au Cd n'est pas corrélé à l'importance de la présence de *Perkinsus* dans les individus (R^2=0,108).

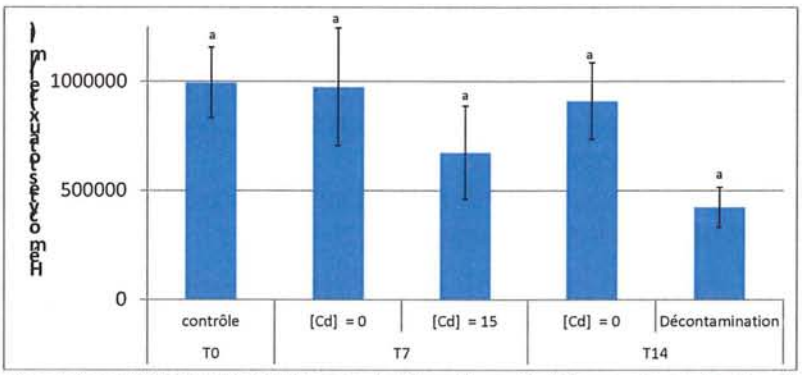


Figure 52 : Hémocytes totaux (THC : Total Hemocyte Count) après 7 jours de contamination (T7) et 7 jours de décontamination (T14).

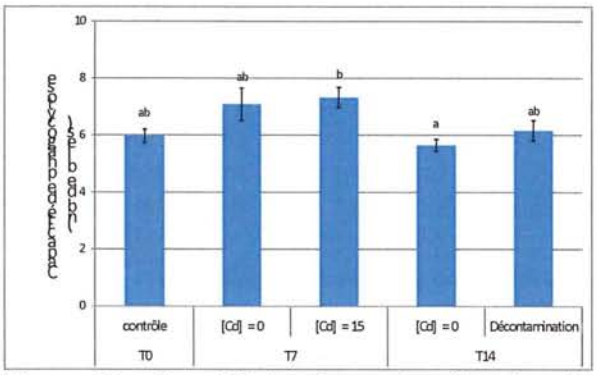


Figure 53 : Capacité de phagocytose (nombre de billes) après 7 jours de contamination (T7) et 7 jours de décontamination (T14).

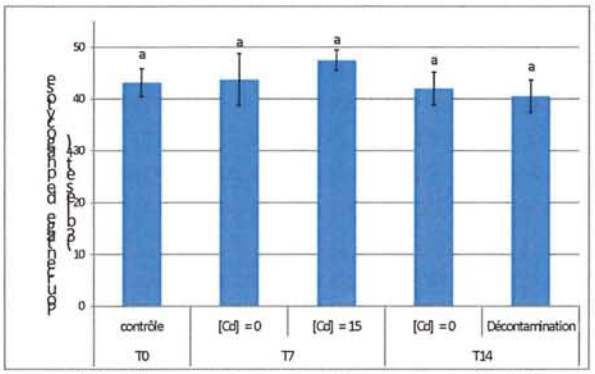


Figure 54 : Pourcentage de phagocytose (3 billes et plus) après 7 jours de contamination (T7) et 7 jours de décontamination (T14).

L'infestation par le protozoaire *Perkinsus* a été évaluée pour chaque individu (comptage des hypnospores dans les branchies). Très peu de palourdes présentent des niveaux d'infestation supérieurs à 10^6 cellules/g de branchies (5%). La **Figure 55** présente l'abondance parasitaire moyenne pour chaque condition expérimentale. La charge parasitaire est extrêmement variable d'un individu à l'autre (de 0 à 3.10^6 cellules/g de branchies) mais la valeur médiane reste inférieure à 10^5 cellules/g de branchies (39.10^4 à $86.\ 10^4$). Les palourdes les plus infestées, qui pourraient être affaiblies, n'accumulent pas plus de Cd dans les branchies **(Figure 56)**.

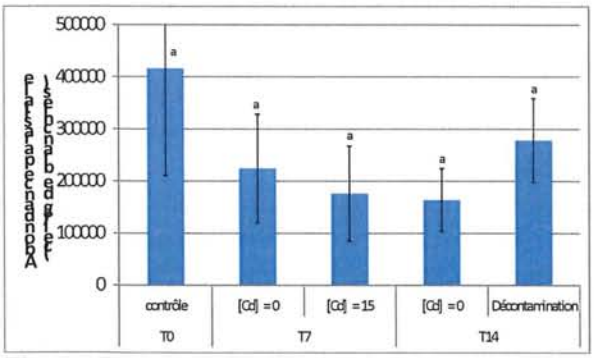


Figure 55 : Abondance parasitaire moyenne en cellules *Perkinsus* /g de branchie pour les différentes conditions expérimentales.

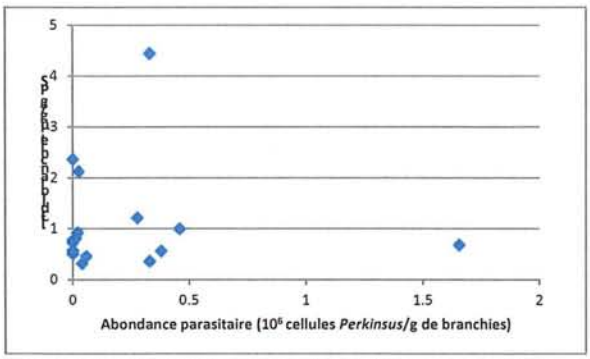


Figure 56 : Relation entre abondance parasitaire et bioaccumulation de Cd dans les branchies des palourdes à T7.

4.2.1.3 Conclusion

L'occurrence du parasite *Perkinsus* ne semble pas affecter les réponses des organismes soumis à une contamination au Cd. En effet, aucun des paramètres mesurés ne peut être corrélé positivement à l'abondance parasitaire au niveau individuel. L'analyse des réponses biochimiques (ATP, MDA : analyses en cours) viendront compléter ces résultats et devront être analysées en regard des charges en *Perkinsus*.

4.2.2 Contamination toxinique

4.2.2.1 Impact d'une exposition à *Pseudo-nitzschia* multiseries

- **Introduction**

Certaines diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* font parties du phytoplancton considéré comme toxique. Elles produisent une neurotoxine, l'acide domoïque, qui peut s'accumuler le long de la chaîne trophique dans les tissus des consommateurs primaires puis secondaires et éventuellement provoquer des mortalités massives chez les vertébrés. L'acide domoïque est une toxine dite amnésiante, homologue de l'acide glutamique, un neurotransmetteur, dont elle prend la place au niveau des synapses neuronales. Cette fixation entraîne, entre autre, des pertes de mémoire à plus ou moins long terme puis la mort. Les oiseaux, mammifères marins et êtres humains sont les plus touchés par ces symptômes. La forte surveillance exercée sur le genre *Pseudo-nitzschia*, dans le monde entier, vient du fait que c'est un genre cosmopolite, capable de former des efflorescences toxiques.

En France on le retrouve très fréquemment à des concentrations allant de quelques centaines jusqu'à plusieurs dizaines de millions de cellules par litre (**Figure 57**). Les toxines du genre *Pseudo-nitzschia* découvertes fin 1987 au Canada lors d'un évènement toxique ont tué 3 personnes et rendu plus d'une centaine d'autres personnes malades. Depuis, ces toxines ainsi que les espèces toxiques de *Pseudo-nitzschia*, ont été beaucoup étudiées. Il s'est avéré que certaines espèces sont toxiques, d'autres pas, et que certaines espèces ont des souches toxiques et des souches non-toxiques. De plus cette toxicité varie en fonction de l'environnement, principalement de la disponibilité en nutriments (macro- et micro-nutriments). Actuellement, aucune explication n'a pu être donnée, aucune règle établie pour savoir quand et pourquoi une souche est toxique ou pas, les diverses études se contredisant souvent.

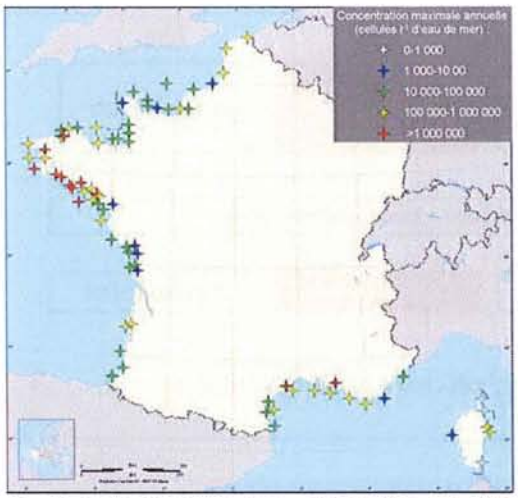


Figure 57 : Efflorescences de *Pseudo-nitzschia* spp. recensées en France pendant l'année 2008 (données l'IFREMER).

- **Choix des souches de *Pseudo-nitzschia* et caractérisation de leur toxicité**

Les études de ce projet ont été menées sur deux espèces de *Pseudo-nitzschia* (**Figure 58**): une espèce toxique, produisant de l'acide domoïque, *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle (souche CLNN16, isolée dans la baie de Fundy, Canada) et une espèce non toxique *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden. Les analyses de mesure de l'acide domoïque ont été effectuées avec le kit Biosense « ASP ELISA » tout au long de ce projet.

Figure 58 : Cellules de *Pseudo-nitzschia delicatissima* Pd08RB et *Pseudo-nitzschia multiseries* CLNN16.

De nombreuses études mettent en évidence que certains facteurs biotiques et abiotiques sont capables de modifier la production d'acide domoïque. La très grande majorité de ces études s'est faite sur des espèces toxiques, la littérature n'a que très rarement comparé les effets d'espèces toxiques et non-toxiques, et jamais au niveau physiologique.
Dans le cas de cette expérience, des carences en silice ont été appliquées pour augmenter la toxicité de *Pseudo-nitzschia multiseries.*

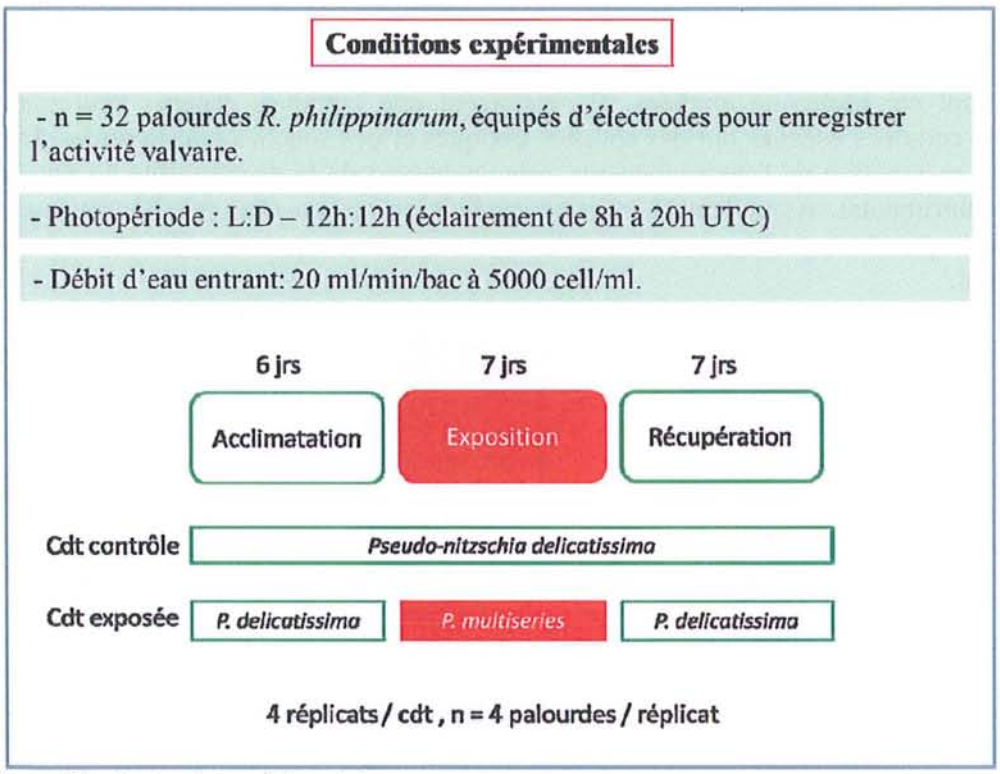


Figure 59 : Protocole expérimental

- **Impact d'une exposition à *Pseudo-nitzschia multiseries* sur la palourde**

Matériel et méthodes

Afin d'évaluer l'impact de la diatomée toxique *Pseudo-nitzschia multiseries* sur la réponse physiologique des palourdes, 128 palourdes naturellement infectées par *Perkinsus olseni* (infection de niveau modéré à fort) ont été collectées le 19/02/2011 dans le bassin d'Arcachon (station 16), distribuées dans 8 bacs de 20L (16 palourdes par bacs, dont 4 d'entre elles équipées d'électrodes reliées à un valvomètre H1N1 dans le but de mesurer l'activité valvaire), remplis de sédiment sur une hauteur d'environ 7 cm, permettant ainsi l'enfouissement des palourdes (**Figure 59**). Les animaux ont été acclimatés pendant 6 jours avec une concentration de 5.10^5 cellules.mL^{-1} d'une espèce de *Pseudo-nitzschia* non toxique, *P.delicatissima.* Après cette phase d'acclimatation (T7), 4 palourdes ont été prélevées par bac pour analyses (cf. § suivant). La moitié des bacs (x4) a été ensuite exposée durant 7 jours à un mélange de 10^5 cellules.mL^{-1} de *Pseudo-nitzschia multiseries* et 5.10^5 cellules.mL^{-1} de *P. delicatissima.* Les 4 autres bacs ont servi de "Contrôles" et n'ont reçu que 5.10^5 cellules.mL^{-1} de *Pseudo-nitzschia delicatissima.* A l'issue de cette exposition (T14), 6 palourdes de chaque bac ont été analysées (dont 2 équipées d'électrodes). Enfin, les palourdes restantes ont subi une phase de dépuration de 7 jours lors de laquelle les 6 dernières palourdes (dont 2 équipées d'électrodes) de chaque bac ont été nourries à raison de 5.10^5 cellules.mL^{-1} de *Pseudo-nitzschia delicatissima*, avant d'être analysées en fin d'expérience (T21).

Les analyses effectuées après acclimatation (T7), exposition (T14) et dépuration (T21) sont les suivantes : activités valvaires, capacités d'enfouissement, production de biodépôts, activités enzymatiques digestives, histopathologie sur coupes transversales de l'animal entier et immunité cellulaire (nombre d'hémocytes circulants, phagocytose, activité oxydative intra-hémocytaire…). Elles permettent une approche intégrée pluridisciplinaire des réponses biologiques et physiologiques des palourdes. D'autre part, l'impact des efflorescences toxiques sur l'interaction hôte/pathogène (palourdes/*Perkinsus olseni)* a été évaluée par la mesure de la charge parasitaire totale dans les branchies -l'organe le plus affecté par la perkinsose- par la méthode RFTM. Le suivi de l'accumulation de l'acide domoïque dans les glandes digestives des palourdes, paramètre indispensable à l'interprétation des réponses biologiques, a été réalisé grâce au kit Biosense « ASP ELISA ».

Résultats

L'activité d'enfouissement et de déplacement des palourdes exposées à *P. multiseries* n'est pas apparue différente de celle des palourdes nourries avec *P. delicatissima* "Contrôle".

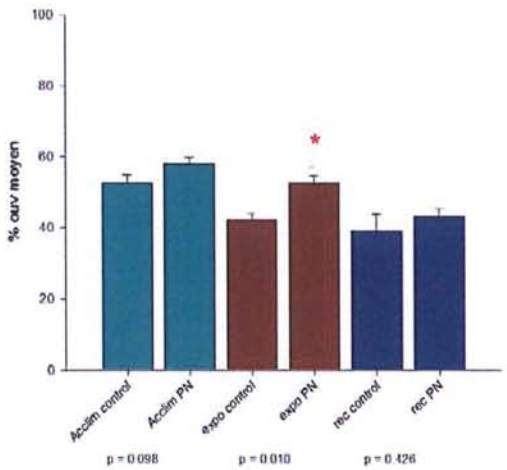


Figure 60 : Durée d'ouverture valvaire pendant l'acclimatation, l'exposition et la récupération chez les palourdes contrôles (nourris avec *Pseudo-nitzschia delicatissima*, algues non toxiques) et les palourdes exposées à *Pseudo-nitzschia multiseries* (produisant les toxines amnésiantes). *significativement diffèrent de la condition contrôle.

L'exposition à *Pseudo-nitzschia multiseries* provoque une augmentation de la durée d'ouverture valvaire pendant l'exposition (**Figure 60**). Par contre, il n'y a pas d'effet sur l'amplitude d'ouverture, ni sur la fréquence des microfermetures. Cet effet disparait pendant la phase de récupération.

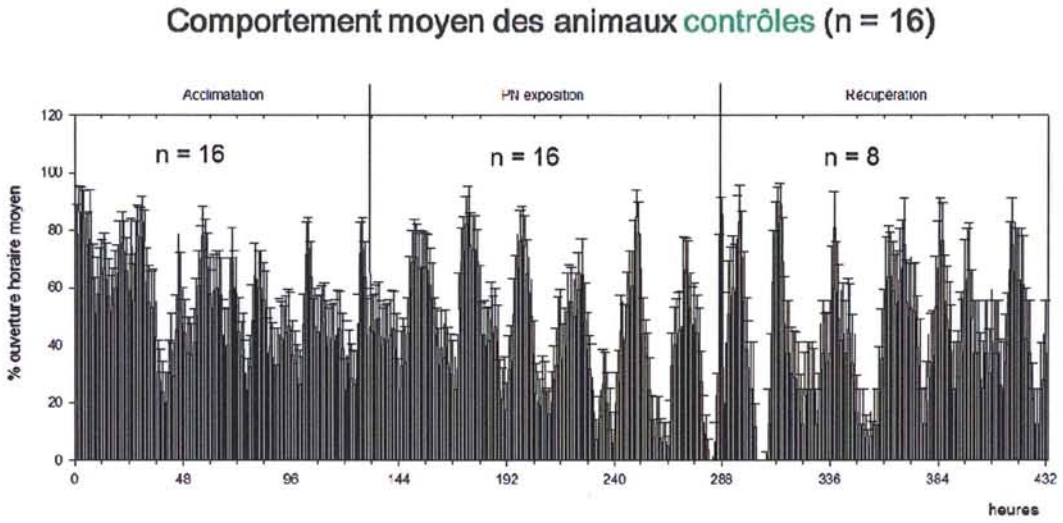


Figure 61 : Durée d'ouverture horaire valvaire moyenne des palourdes contrôles, nourris avec *Pseudo-nitzschia delicatissima* (non toxique) pendant la phase d'acclimatation (6 jours), la phase correspondant à la phase d'exposition (7 jours) et la phase de récupération). n = 16 pour la phase acclimatation et exposition, n = 8 pour la phase de récupération.

Tableau 14 : Analyse chronobiologique du rythme circadien des palourdes contrôles, pour les 3 phases étudiées. Un rythme circadien est validé si : les tests d'autocorrélations sont validés (test l'existence d'une périodicité des données et que celle-ci n'est pas due à un phénomène aléatoire) ; l'analyse spectrale détermine une période statistique (*p*-value = 0.05) ; le modèle rythmique Cosinor est validé par un rejet du test de l'Ellipse (E OK) et avec une *p*-value = 0.05. Le percent rhythm (PR) détermine le pourcentage expliqué du comportement de la palourde par le modèle Cosinor.

Conditions	% ouverture valvaire ± ES	Test ANOVA non paramétrique Acclim	Expo	Autocorrelation & PACF(test si période biologique)	Analyse spectrale (periodogramme Lomb&Scargle)	Modèle COSINOR (validé par p-value et le rejet du test de l' Ellipse (E)) Percent Rhythm (PR, % rythmique expliqué par le modèle)	Rythme circadien
Acclimatation	52.4 ± 1.5%			No	25.9±0.06h	$p = 0.0052$;E Ok; PR=41.88%	Non
exposition	42.0 ± 1.6%	S		Ok	23.4±0.03h	$p = 0.0016$:E Ok: PR= 71.17%	Oui
récupération	39.1 ± 1.7%	S	NS	Ok	25.0±0.03h	$p = 0.0205$;E Ok; PR= 58.49%	Oui

Chez les animaux contrôles (non exposés à *Pseudo-nitzschia multiseries*), après la phase d'acclimatation aux conditions expérimentales, le rythme circadien de l'activité valvaire est bien établi et le PR (**pourcentage expliqué du comportement de la palourde par le modèle Cosinor)** est élevé, avec respectivement 71,2 et 58,5 % pour la phase d'exposition et la phase de récupération (**Figure 61, Tableau 14**).

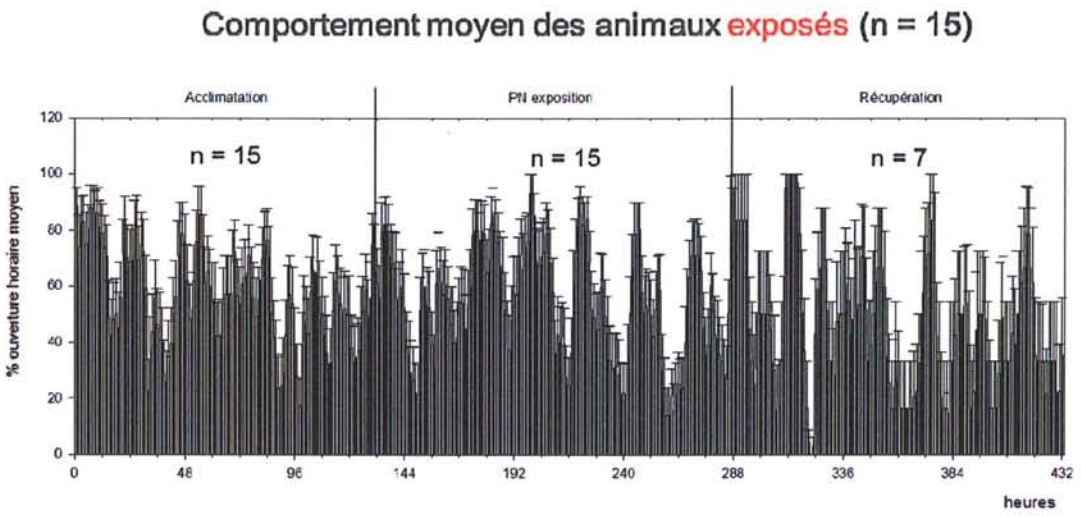


Figure 62 : Durée d'ouverture horaire valvaire moyenne des palourdes « contrôles », nourris avec *Pseudo-nitzschia multiseries* (algues toxiques produisant toxines ASP) pendant la phase d'acclimatation (6 jours), la phase correspondant à la phase d'exposition (7 jours) et la phase de récupération). n = 15 pour la phase acclimatation et exposition, n = 7 pour la phase de récupération.

Chez les animaux exposés à *Pseudo-nitzschia multiseries*, après la phase d'acclimatation aux conditions expérimentales, le rythme circadien de l'activité valvaire est présent pendant la phase d'exposition, mais ne l'est plus pendant la phase de récupération (**Figure 62, Tableau 15**). De plus la durée d'ouverture valvaire diminue pendant la phase de récupération (comparée à la phase d'exposition).

Tableau 15 : Analyse chronobiologique du rythme circadien de palourdes exposées à l'algue *Pseudo-nitzschia multiseries (produisant les toxines paralysantes ASP)*, pour les 3 phases étudiées. Un rythme circadien est validé si : les tests d'autocorrélations sont validés (test l'existence d'une périodicité des données et que celle-ci n'est pas due à un phénomène aléatoire) ; l'analyse spectrale détermine une période statistique (*p*-value = 0.05) ; le modèle rythmique Cosinor est validé par un rejet du test de l'Ellipse (E OK) et avec une *p*-value = 0.05. Le percent rhythm (PR) détermine le pourcentage expliqué du comportement de la palourde par le modèle Cosinor.

Conditions	% ouverture valvaire ± ES	Test, ANOVA non paramétrique Acclim	Expo	Autocorrelation & PACF(test si période biologique)	Analyse spectrale (periodogramme Lomb&Scargle)	Modèle COSINOR (validé par p-value et le rejet du test de l' Ellipse (E)) Percent Rhythm (PR, % rythmique expliqué par le modèle)	Rythme circadien
Acclimatation	57.9 ± 1.5%			No	24.4±0.06h	$p = 0.08$; E No	Non
exposition	54.1 ± 1.5%	NS		Ok	22.7±0.04h	$p = 0.0004$; E Ok; PR= 58.67%	Oui
récupération	45.3 ± 1.9%	S	S	No	20.5±0.06h	$p = 0.0273$; E Ok; PR= 40.75%	Non

Dans les deux conditions, les palourdes ont filtré la totalité des microalgues en suspension. L'indice de condition des palourdes n'a pas été modifié de façon significative au cours de l'expérience, et aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les deux traitements.
Les palourdes exposées pendant 7 jours à *P. multiseries* ont accumulé de l'acide domoïque, qui a disparu ensuite, lors de la période de dépuration (**Figure 63**).
La mesure, sur extrait de palourdes, de l'activité de trois enzymes digestives - amylase, cellulase, laminarinase - montre qu'il n'y a aucune différence significative quant à l'activité de ces trois enzymes digestives entre les palourdes nourries avec la diatomée toxique ou avec la non-toxique (**Figure 64**).

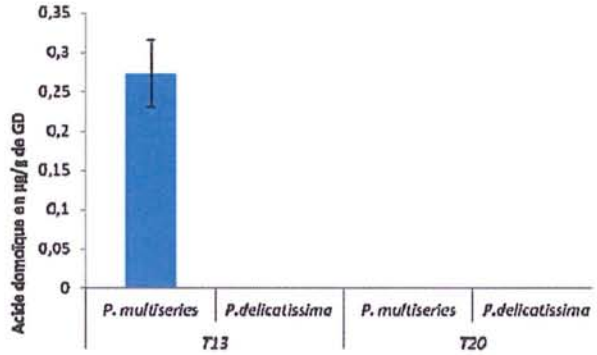


Figure 63 : Présence d'acide domoïque dans la glande digestive de palourdes.

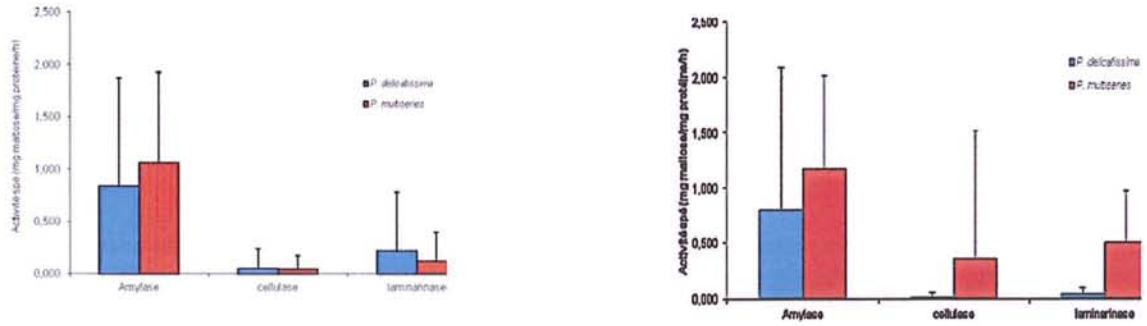


Figure 64 : Activité des enzymes digestives mesurée sur la glande digestive de palourdes exposées ou non à *Pseudo-nitzschia* toxique

Aucune différence significative de la charge parasitaire n'a pu non plus être mise en évidence entre les différents traitements. Les analyses histologiques n'ont pas non plus permis de mettre en évidence l'effet de *Pseudo-nitzschia* toxique sur les tissus de palourdes.
Les réponses hémocytaires mesurées ont été aussi faiblement affectées par l'exposition à la diatomée toxique. En effet, le nombre et la morphologie des hémocytes circulants, la capacité de phagocytose, la production d'espèces réactives de l'oxygène n'ont pas été affectés par la présence de *P. multiseries*. En revanche, une exposition à *P. multiseries* a provoqué une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial (PMM), observable directement après exposition, mais aussi après 7 jours de dépuration (**Figure 65**), période à laquelle a aussi été observée une augmentation de la mortalité des hémocytes circulants (**Figure 65**).

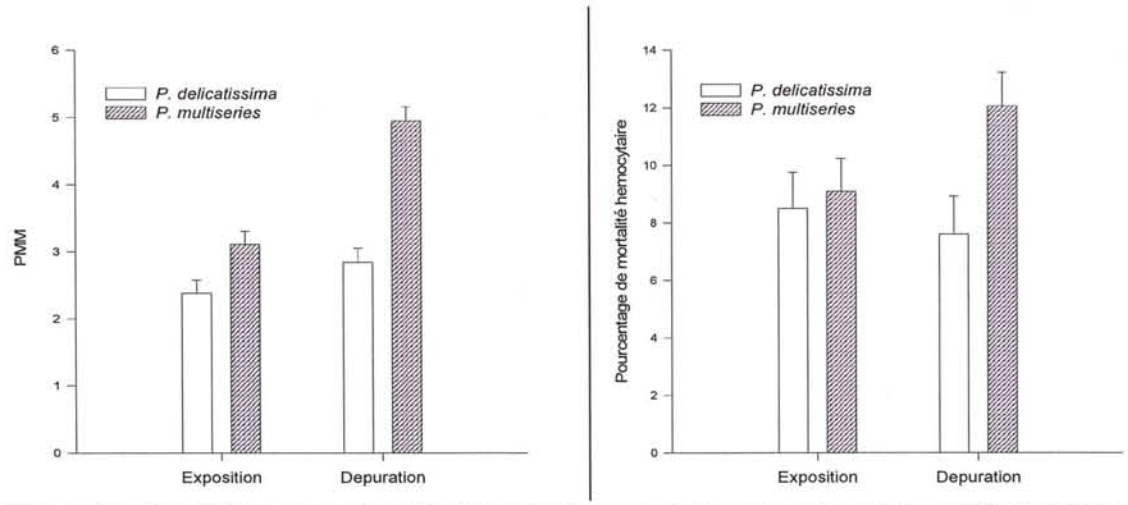


Figure 65 : Potentiel membranaire mitochondrial (à gauche) et pourcentage de mortalité des hémocytes (à droite) de palourdes exposées ou non à *Pseudo-nitzschia* toxique.

Conclusion

Une exposition de 7 jours des palourdes *R. philippinarum* à la diatomée toxique *P. multiseries* a provoqué l'accumulation d'acide domoïque, dont la dépuration a eu lieu en moins de 7 jours. L'exposition à *P. multiseries* toxique a eu peu d'effet sur les réponses physiologiques des palourdes. Ces résultats concordent avec la littérature, qui reporte par exemple peu d'effet de *Pseudo-nitzschia* toxique sur la physiologie des pétoncles canadiens *Placopecten magellanicus* (Douglas et al 1997). Seules une faible augmentation du pourcentage d'ouverture des palourdes et une augmentation du PMM suite à 7 jours d'exposition à *P. multiseries* toxique ont pu être observées ; cette augmentation de PMM et une augmentation du pourcentage de mortalité des hémocytes ont aussi été vues après 7 jours de dépuration. Mafra et al. (2009) ont mis en évidence chez les huîtres *Crassostrea virginica* une sélection pré-ingestive au niveau des branchies, entrainant le rejet préférentiel sous forme de pseudofeces des cellules de *P. multiseries*. Ces observations pourraient permettre d'expliquer le plus grand pourcentage d'ouverture.

4.2.2.2 Impact d'une exposition à *Alexandrium ostenfeldii* sur la palourde

- Introduction

Les spirolides ont été détectées au cours des années 90 dans plusieurs pays européens (Canada, Espagne, Italie, Ecosse, Norvège, Danemark et France). *Alexandrium ostenfeldii* a été identifié comme la principale source de spirolides (**Figure 66**). Les spirolides forment un nouveau groupe d'imines cycliques aussi connues sous le terme de « Fast Acting Toxins » (FAT) du fait de leur effet sur des souris inoculées i.p.. Suivant leur origine, les souches *d'A. ostenfeldii* ne produisent pas les mêmes toxines : soit seulement des spirolides (SPX), soit seulement des toxines paralysantes (PSP), soit les deux (Ciminiello et al., 2006).

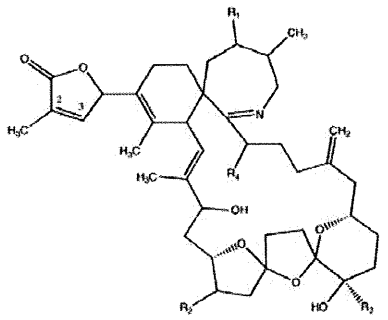


Figure 66 : Structure chimique de base des spirolides 'actifs'

Récemment des interdictions de ventes de coquillages ont affecté le bassin d'Arcachon. Pendant ces évènements toxiques et depuis 2005, les analyses chimiques réalisées ont mis en évidence la présence de spirolides en faibles concentrations dans les huîtres, les moules et les palourdes.
La LD50 (dose létale pour obtenir 50% de mortalité) d'un mélange de spirolides contenant principalement du 13-desMeC est de 40µg/kg par injection intra péritonéale chez la souris et de 1 mg/kg par voie orale. Il n'y a aucun élément concernant la toxicité des spirolides sur l'Homme et de ce fait elles ne sont pas règlementées. Néanmoins, l'effet de ces spirolides sur les bivalves filtreurs et fouisseurs n'a jamais été évalué. C'est donc le dinoflagellé *A. ostenfeldii* qui a été choisi pour évaluer l'impact des spirolides sur les palourdes du bassin d'Arcachon. La souche d'*A. ostenfeldii* utilisée dans cette étude (CCMP 1773) est originaire du Danemark et ne peut synthétiser, dans les conditions de culture du laboratoire, que des spirolides.

- **Culture d'*A. ostenfeldii* en batch et en photobioréacteur et caractérisation de sa production toxique en spirolides**

Voir § 5.

- **Impact d'une exposition à *Alexandrium ostenfeldii* sur la palourde**

Expérience n°1 à Brest (LEMAR & PHYC)

Matériel et méthodes

Afin d'évaluer l'impact du dinoflagellé toxique *Alexandrium ostenfeldii* sur la réponse physiologique des palourdes, 128 palourdes naturellement infestées par *Perkinsus olseni* (infection de niveau modéré à fort) ont été collectées le 19/02/2010 dans le bassin d'Arcachon (station 16), distribuées dans 8 bacs de 20 L (16 palourdes par bacs), remplis d'une hauteur d'environ 7 cm de sédiment, permettant ainsi l'enfouissement des palourdes. Les animaux ont été acclimatés pendant 6 jours avec une concentration de 5.10^5 cellules.mL^{-1} d'une espèce de micro-algue fourrage, *Isochrysis affinis galbana* clone Tahitian (T-Iso). Après cette phase d'acclimatation (T7), 4 palourdes ont été prélevées par bac pour analyses (cf. § suivant). La moitié des bacs (x4) a été ensuite exposée durant 7 jours à un mélange de 10^3 cellules.mL^{-1} d'*Alexandrium ostenfeldii* et 5.10^5 cellules.mL^{-1} de T-iso (condition *A. ostendfeldii*) Les 4 autres bacs ont servi de "contrôles" et n'ont reçu que 5.10^5 cellules.mL^{-1} de T-Iso (condition T-iso ou contrôle). A l'issue de cette exposition (T14), 6 palourdes de chaque bac ont été analysées. Enfin, les palourdes restantes ont subi une phase de dépuration de 7 jours lors de laquelle les 6 dernières palourdes de chaque bac ont été nourries à raison de 5.10^5 cell.mL^{-1} de T-Iso, avant d'être analysées en fin d'expérience (T21).

Les analyses effectuées après acclimatation (T7), exposition (T14) et dépuration (T21) sont les suivantes : capacités d'enfouissement, production de biodépôts, activités enzymatiques digestives, histopathologie sur coupes transversales de l'animal entier, immunité cellulaire (nombre d'hémocytes circulants, phagocytose, activité oxydative intra-hémocytaire...) et humorale (titre d'agglutination, phénoloxydase...), activité métabolique (potentiel membranaire mitochondrial). Elles permettent une approche intégrée des réponses biologiques et physiologiques des palourdes. D'autre part, l'impact des efflorescences toxiques sur l'interaction hôte/pathogène (palourdes/*Perkinsus olseni*) a été évalué par la mesure de la charge parasitaire totale dans les branchies (l'organe le plus affecté par la perkinsose) par la méthode RFTM. Le suivi de l'accumulation de spirolides par les palourdes (sur glande digestive et reste de chair, 3 pools de palourdes par condition), paramètre indispensable à l'interprétation des réponses biologiques, a été réalisé par le laboratoire EMP/PHYC d'IFREMER en utilisant une technique de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (CL/SM-SM).

Résultats et discussion

L'activité d'enfouissement et de déplacement des palourdes exposées à *A. ostenfeldii* n'est pas apparue différente de celle des palourdes nourries avec T-Iso seule. Dans les deux conditions, les palourdes ont filtré la totalité des microalgues en suspension. L'indice de condition des palourdes a augmenté de façon significative au cours de l'expérience, mais aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les deux traitements. L'observation des biodépôts indique aussi que les palourdes nourries avec *A. ostenfeldii* les ont ingérés, mais pas entièrement digérés, comme l'indique la présence de cellules intactes d'*A. ostenfeldii* dans les fèces (**Figure 67**).

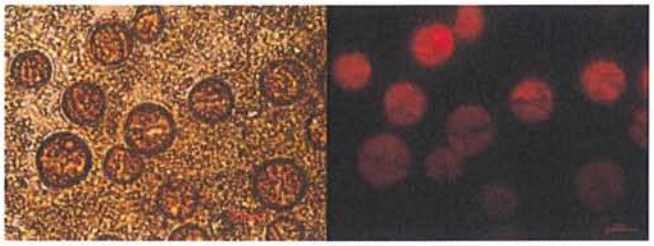


Figure 67 : Présence de cellules intactes d'*Alexandrium ostenfeldii* dans les fèces de palourdes

Les palourdes exposées pendant 7 jours à *A. ostenfeldii* ont accumulé des spirolides, sous trois formes différentes : la 13.19 didesMeC, la 13.desMeC en proportion majeure et la 13.desMeD en quantité plus mineure. Après la période de décontamination (T14 à T21), la quantité de 13.19 didesMeC diminue fortement, alors que la 13.desMeC perdure en quantité importante (**Figure 68**). Les palourdes "Contrôles" étaient elles aussi faiblement contaminées par des spirolides, mais uniquement sous forme de 13-desMeC, confirmant ainsi que les palourdes d'Arcachon sont naturellement exposées à *A. ostenfeldii*.

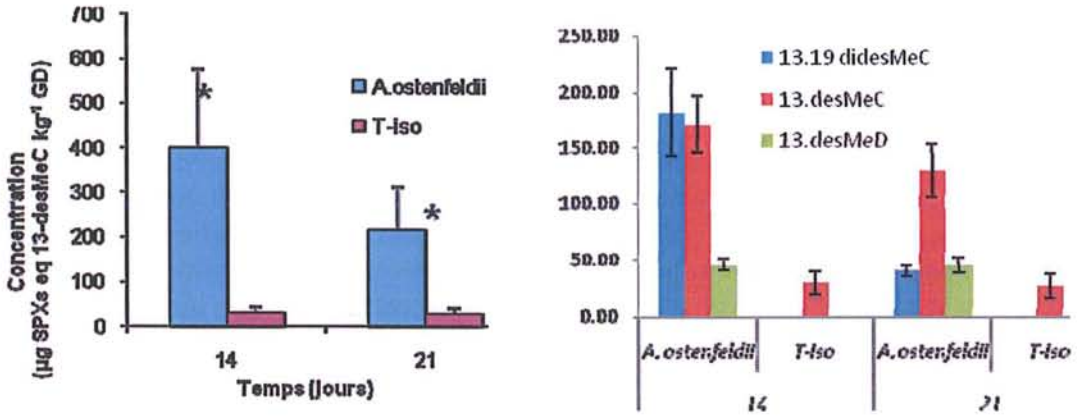


Figure 68 : Présence de spirolides dans la glande digestive de palourdes.

On note une diminution de la charge parasitaire *(P. olseni)* chez toutes les palourdes après 21 jours de maintien en conditions expérimentales sans qu'il soit possible de différencier les animaux exposés à *A. ostenfeldii* des animaux seulement nourris avec T-iso

L'analyse du potentiel membranaire mitochondrial (PMM) mesuré sur les hémocytes montre une baisse de ce potentiel après 7 jours d'exposition à *A. ostenfeldii*, sans effet de récupération après dépuration (**Figure 69**). Considérant que les spirolides sont toujours présentes pendant la phase de récupération, elles pourraient agir de façon indirecte sur le PMM. En effet, la SPX 13-desMeC agit sur les récepteurs acetylcholine nicotinique des systèmes nerveux centraux des souris et des rats (Gill et al. 2003, Bourne et al 2010, Hauser et al 2012). Cette toxine pourrait ainsi affecter les équilibres ioniques et osmotiques et entraîner des variations de PMM.

Les réponses immunitaires humorales mesurées, production de lectines et d'activité phénoloxidase, n'ont pas été affectées par *A. ostenfeldii*.

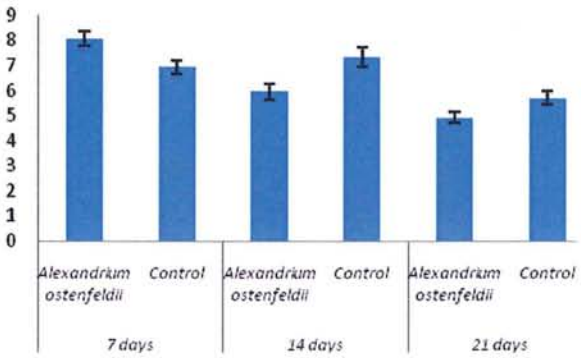


Figure 69 : Potentiel membranaire mitochondrial mesuré sur les hémocytes de palourdes exposées ou non à *A. ostenfeldii*

L'observation des coupes histologiques a permis de révéler l'impact d'*A. ostenfeldii* et de *P. olseni* sur les tissus de palourdes : l'infection par le parasite *P. olseni* est associée à une forte présence d'encapsulations accompagnées d'infiltrations hémocytaires, dans la majorité des organes. L'estimation des niveaux d'infection par *P. olseni* par analyse histologique est globalement similaire aux résultats obtenus par comptage selon la méthode RFTM. L'infection par *P. olseni* semble aussi induire une augmentation des phénomènes de desquamation et de vacuolisation. La variabilité d'infection par *P. olseni* induit donc une variabilité au niveau de certains caractères étudiés. Ceci sera donc à prendre en compte lors de l'analyse des effets d'*A. ostenfeldii*.
Les effets d'une exposition de 7 jours à *A. ostenfeldii* s'observent d'abord au niveau des organes en contact avec le milieu extérieur (et notamment aux algues qu'il contient), par des œdèmes dans le manteau et par des infiltrations hémocytaires dans les branchies indiquant une réponse inflammatoire. Ces effets ne sont probablement pas dus aux spirolides (endotoxines libérées par la digestion) mais plutôt à des composés extracellulaires ou membranaires produits par *A. ostenfeldii*. En effet, *A. ostenfeldii* est connue pour produire des composés allélopathiques capable d'immobiliser et de lyser des protistes (Tilmann et al 2007). Ford et al (2008) ont également démontré l'effet des produits extracellulaires *d'Alexandrium tamarense* sur les fonctions hémocytaires de deux espèces de palourdes. La diminution des activités SOD (les deux isoformes Cu/Zn et Mn dépendantes) dans les branchies pourrait être associée à la vacuolisation de ce tissu et/ou à la diminution du PMM des hémocytes.

L'exposition à *A. ostenfeldii* affecte aussi fortement le système digestif des palourdes (**Figure 70**). Des cellules intactes d'*A. ostenfeldii* sont observées dans la lumière du système digestif (**Figure 70**). De plus, l'exposition pendant 6 jours à *A. ostenfeldii* semble provoquer une augmentation des infiltrations hémocytaires au niveau de la glande digestive (**Figure 70**), ainsi qu'une augmentation de la présence de squames dans la lumière de l'intestin et une vacuolisation (**Figure 71**) plus importante au niveau des tubules digestifs. Enfin, une forte intensification des diapédèses hémocytaires (**Figure 70**) ainsi que l'augmentation de la présence de « brown cells » dans la lumière de l'intestin peuvent aussi être observées. Ce type d'observation a déjà été rapporté sur des palourdes et des huîtres après exposition à *Prorocentrum minimum* et à *Alexandrium minutum*, respectivement (Hégaret et al., 2009; Haberkorn et al., 2010a,b). La présence de « brown cell » dans les tissus pourrait être associée à des processus de détoxication et de dégradation de substances organiques et inorganiques solubles (Zaroogian et al., 1989; Zaroogian and Yevich, 1994).

Les activités enzymatiques digestives (amylase, cellulase et laminarinase) ne sont pas affectées par l'exposition à *A. ostenfeldii*.

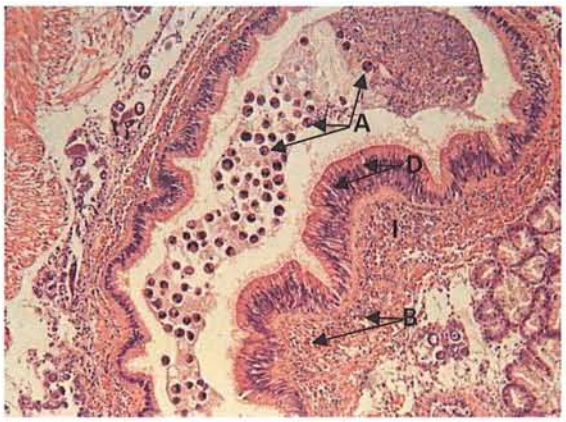


Figure 70 : Système digestif d'une palourde exposée à *A. ostenfeldii*. Présence d'*A. ostenfeldii* (A) dans la lumière de l'intestin, infiltration hémocytaire (I), hémocytes en diapédèse (D) et présence de « brown cells » (B).

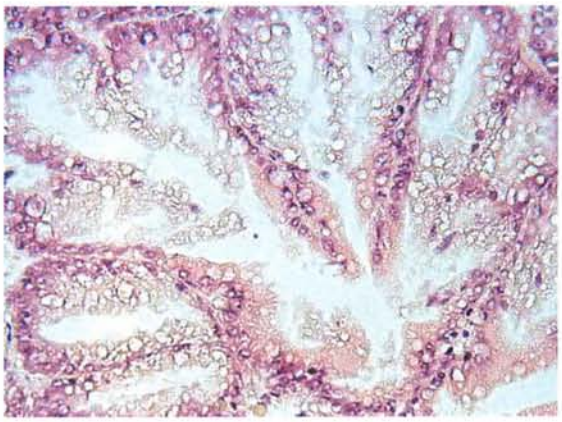


Figure 71 : Vacuolisation des tubules digestifs de palourde exposée à *A. ostenfeldii*

En résumé, une exposition de 7 jours des palourdes *R. philippinarum* au dinoflagellé toxique *A. ostenfeldii* a provoqué l'accumulation de spirolides. La présence d'*A. ostenfeldii* a d'abord affecté les branchies et le manteau probablement via la production de composés toxiques extracellulaires ou membranaires. L'exposition à *A. ostenfeldii* a également fortement perturbé le système digestif des palourdes en provoquant une forte réaction inflammatoire avec infiltration massive des hémocytes dans la glande digestive et diapédèse hémocytaire vers la lumière de l'intestin où se trouvent des cellules intactes d'*A. ostenfeldii*. Cette infiltration massive d'hémocytes dans les différents compartiments digestifs est peut-être reliée à la diminution du potentiel membranaire mitochondrial de ces hémocytes. Des observations relativement similaires ont été effectuées sur d'autres espèces de bivalves (huîtres, moules, pétoncles) exposées à plusieurs espèces d'*Alexandrium* (Estrada et al. 2007, 2010, Hégaret et al. 2007a,b, Galimany et al. 2008, Haberkorn et al. 2010 a et b, Medhioub et al. 2012).

Expérience n°2 à Nantes (PHYC & LEMAR)

Matériel et méthodes

Des palourdes, collectées dans le bassin d'Arcachon, ont été exposées de façon continue à 200-600 cellules.mL^{-1} pour *A. ostenfeldii* et à 1000 – 1200 cellules.mL^{-1} pour *H. triquetra* pendant 7 jours. Au cours de cette exposition, des émissions de gamètes ont été notées dans le raceway recevant la culture d'*A. ostenfeldii*. Les analyses biologiques et chimiques ont été réalisées comme décrit précédemment dans l'expérience n°1.

Résultats et discussion

Dans cette expérimentation en raceway, les palourdes se sont peu contaminées, presque 10 fois moins que dans l'expérience à Brest pour des conditions et des durées d'exposition similaires. Après 7 jours d'exposition, la concentration de spirolides atteint 60,7µg éq. SPX kg^{-1} dans la glande digestive et 68,5µg éq. SPX kg^{-1} dans la chair restante. Seule l'hypothèse d'une interférence avec la maturation des palourdes pourrait expliquer cette faible accumulation.

Les taux de filtration (CR) et de consommation (FR) ne différent pas entre les deux raceways et montrent une évolution comparable, soit une décroissance les deux premiers jours pour atteindre un niveau moyen à faible du troisième au quatrième jour d'expérience. Dans les deux cas, la maturation des palourdes semble avoir interféré avec les processus de nutrition.

Les biodépôts cumulés produits lors des trois premiers jours étaient équivalents entre les deux raceways. Cependant, lorsqu'il y a eu une émission de gamètes, on a pu constater une forte diminution de la production de fèces par les individus exposés à *A.ostenfeldii*. Les bio-dépôts dans ce raceway n'étaient plus représentés que par des pseudo-fecès dans lesquelles le mucus enrobait aussi bien des cellules d'*A. ostenfeldii* que des gamètes. Reste à savoir si la nourriture 'toxique' avec *A.ostenfeldii* représentait ou non un stress suffisant pour déclencher la ponte.
Aucune différence de niveaux d'infestation à *Perkinsus olsenii* n'a été observée après 7 jours d'exposition.
Les comptages totaux d'hémocytes dans l'hémolymphe (**Figure 72**) sont significativement plus forts dans les palourdes 'exposées' que les palourdes témoins ce qui pourrait révéler une réponse inflammatoire à l'exposition à *A. ostenfelfdii*.

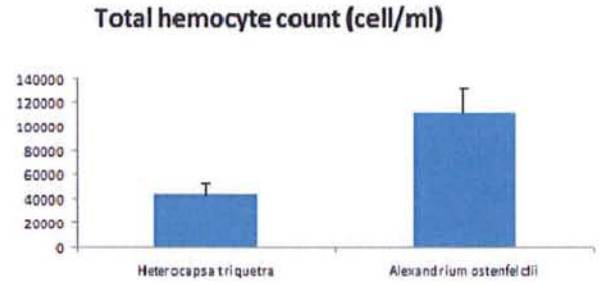


Figure 72: 'Total Hemocyte Counts' sur l'hémolymphe des palourdes exposées (*A. ostenfeldii*) et des palourdes témoins (*H. triquetra*) au bout de sept jours d'exposition

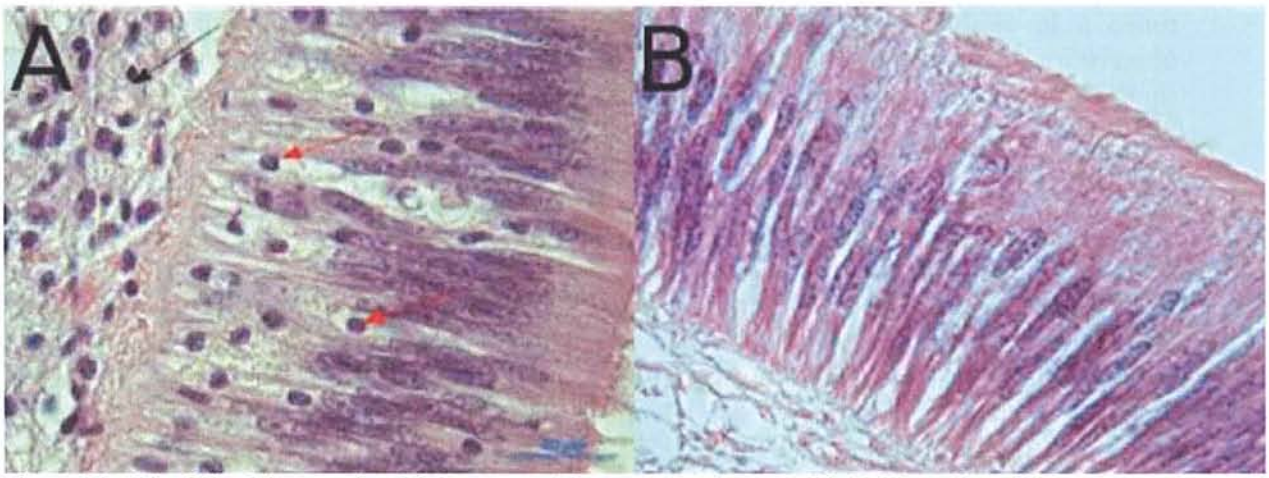


Figure 73 : Diapédèse hémocytaire (flèches rouges) à travers les tissus de l'épithélium digestif des palourdes exposées à *A.ostenfeldii* (A) contre un épithélium 'témoin' sans infiltration d'hémocytes (B).

L'induction d'une réponse inflammatoire par *A. ostenfeldii* est effectivement observée dans la glande digestive des palourdes (**Figure 73**). Elle se traduit par i) une infiltration d'hémocytes dans les tissus de la glande digestive des palourdes nourries avec *A. ostenfeldii*, et ii) une migration des hémocytes à travers l'épithélium du tube digestif des palourdes exposées : diapédèse hémocytaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans l'expérience n°1. En revanche cette réponse inflammatoire semble sans effet sur l'infestation parasitaire à *Perkinsus*.
On constate également une diminution du nombre de vésicules digestives chez les individus exposés et davantage d'hémocytes dans la lumière de l'intestin des individus exposés. Par

contre, il ne semble pas y avoir d'altération significative des filaments branchiaux comme cela a pu être observé dans l'expérience n°1.

Expérience n°3 à Nantes (PHYC & LEMAR)

En complément des précédentes expériences, une dernière expérience permettant des analyses écophysiologiques au niveau individuel a été réalisée.

Matériel et méthodes

Le système expérimental en circuit fermé comprend deux stands constitués de 11 boîtes individuelles d'une contenance de 800 ml. Chaque stand comporte une boîte « témoin » contenant deux coquilles de palourdes vides et de 10 boîtes contenant chacune deux palourdes. Un flux circulant d'eau de mer (salinité = 35 et température = 16.5 ± 0.3 °C) est maintenu constant à un débit régulier de 75 ± 5 $mL.min^{-1}$. Le premier stand recevait le phytoplancton toxique (*A. ostenfeldii*) à la concentration maintenue constante de 200 $cellules.mL^{-1}$ et le deuxième stand recevait une culture non toxique d'*H. triquetra* à la concentration de 1000 $cellules.mL^{-1}$.

Différents paramètres écophysiologiques ont été mesurés. Le pourcentage d'activité alimentaire correspond au rapport entre le temps où l'animal est actif et l'ensemble du temps d'enregistrement. On considère l'animal actif si la diminution de la fluorescence en sortie de boîte est supérieure d'au moins 5 % à la fluorescence de la boîte témoin. Le taux de filtration (Clearance Rate ou CR) est exprimé en $L\ h^{-1}\ g^{-1}$ à partir de la relation suivante : $CR = [(Fluo_{entrée} - Fluo_{sortie}) / Fluo_{entrée}] \times Débit$.

Pour les mesures du taux de consommation, la matière en suspension, les fèces, et les pseudo-fèces sont quantifiés. Le taux de consommation (FR) est ensuite estimé comme la quantité de matière retenue pour chaque individu. Il est exprimé en $mg.L^{-1}.g^{-1}$et on le calcule par la relation suivante : FR = CR x TPM avec TPM = matière particulaire totale (en $mg.L^{-1}$).

Résultats et discussion

Les glandes digestives des palourdes issues du bassin d'Arcachon contenaient déjà des toxines spirolides (SPX desMe C) soit 5 µg $eq_{SPX1}\ Kg^{-1}$ avant la phase d'exposition à *A. ostenfeldii* (**Tableau 16**). Cela pourrait confirmer la présence d'une espèce *A. ostenfeldii* 'toxique' dans le bassin d'Arcachon.

Après exposition à *A. ostenfeldii*, les glandes digestives présentent des teneurs élevées en 13-desMe C (362 µg $eq_{SPX1}\ Kg^{-1}$) et en 13, 19 didesMe C (290,1 µg $eq_{SPX1}\ Kg^{-1}$). A l'opposé, les animaux exposés à *H. triquetra* ne contiennent que peu de spirolides, principalement de la 13-desMe C (3 µg $eq_{SPX1}\ Kg^{-1}$).

Tableau 16 : Valeurs de toxicité totale en µg eq.SPX1 obtenues pour les différents groupes, par kg de chair totale (incluant la GD) et par kg de glande digestive (GD).

Echantillons	TOXICITE TOTALE en µg eq_{SPX1}/Kg CT	TOXICITE TOTALE En µg eq_{SPX1}/Kg GD
Avant exposition	1,0	5
A. ostenfeldii	133,7	669
H. triquetra	0,5	3

L'accumulation de spirolides en 4 jours est significative et importante en particulier dans la glande digestive des palourdes exposées, soit 669 µg eq SPX1 Kg^{-1} avec la présence de 13-desMeC et de 13, 19-didesMeC. Bien que les taux de filtration soient plus faibles chez les individus exposés par rapport aux témoins (voir ci-après), la contamination par voie

alimentaire a été 10 fois plus importante dans cette expérience que dans l'expérience n°2 ci-dessus.

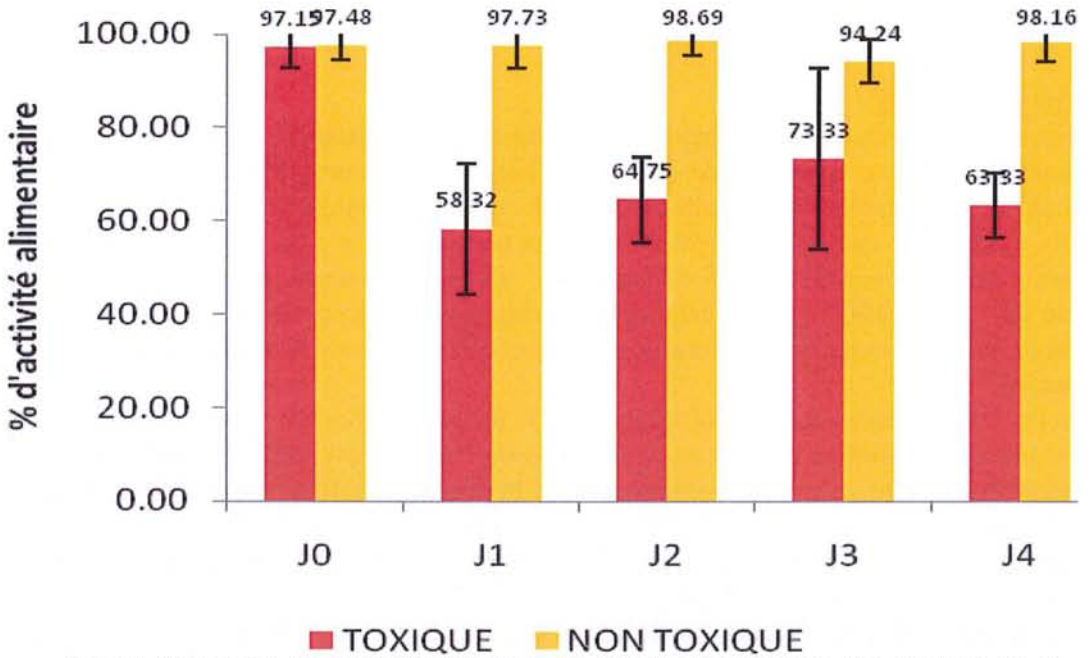


Figure 74 : Histogramme représentant les différentes valeurs des pourcentages d'activité pour les stands recevant une alimentation toxique et non toxique. Les barres d'erreurs standard sont représentées sur le graphique

On observe une très forte diminution du pourcentage d'activité entre le jour 0 et le jour 1 ($J0_{toxique}$ = 97,1 ± 4,3 et $J1_{toxique}$ = 58,3 ± 14,0) puis l'activité reste constante jusqu'au dernier jour de contamination (**Figure 74**).

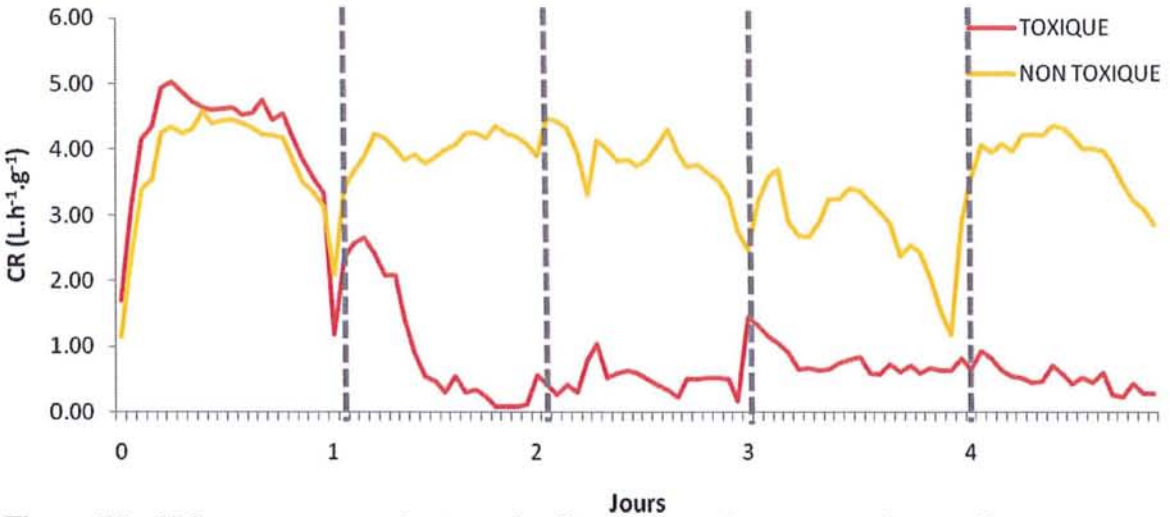


Figure 75 : Valeurs moyennes du taux de filtration par heure pour les stands recevant une alimentation toxique et non toxique.

Dès que les palourdes reçoivent une alimentation toxique, leur taux de filtration diminue significativement et fortement ($CR_{toxique}$ = 0,71 ± 1,60 $L.h^{-1}.g^{-1}$) alors que les palourdes

recevant une alimentation non toxique maintiennent un taux de filtration élevé pendant toute l'expérience ($CR_{non\ toxique} = 3,62 \pm 0,48\ L.h^{-1}.g^{-1}$) (**Figure 75**).

Tableau 17 : Récapitulatif des valeurs des taux moyens de consommation pour la fraction totale (FR) et la fraction organique (OFR).

($mg.h^{-1}.g^{-1}$)	FR	OFR
A. ostenfeldii	2.17 ± 0.78	1.80 ± 0.65
H. triquetra	8.07 ± 1.22	6.69 ± 1.01

Les valeurs de l'estimation de la consommation (FR et OFR) suivent la même tendance (**Tableau 17**) que celles du taux de filtration (CR). Les valeurs de consommation pour les individus recevant une alimentation toxique sont très significativement ($p<0,001$) plus faibles que celles des animaux recevant le dinoflagellé non toxique.
La quantité totale de biodépôts produits atteint 62 mg pour les palourdes nourries avec *H. triquetra* et 42 mg pour celles ayant été nourris avec *Alexandrium ostenfeldii* avec une proportion plus importante de pseudo-fèces pour ces dernières ($fèces_{toxique} = 24$ mg et $fèces_{non\ toxique} = 56$ mg ; $pseudo\text{-}fèces_{toxique} = 18$ mg et $fèces_{non\ toxique} = 6$ mg) (**Figure 76**).

L'ensemble de ces changements écophysiologiques révèle que les palourdes réduisent leur activité alimentaire au sens large quand elles sont exposées à *A. ostenfeldii,* productrice de spirolides. Néanmoins, les quantités de spirolides accumulées restent importantes. Il n'a pas été observé de différence significative au niveau des activités valvaires. Cela révèle que les palourdes ne ferment pas leurs valves quand elles sont exposées à *A. ostenfeldii* comme cela a pu être observé pour les huîtres exposées à des *Alexandrium* productrices de PST (Lassus et al, 2002).

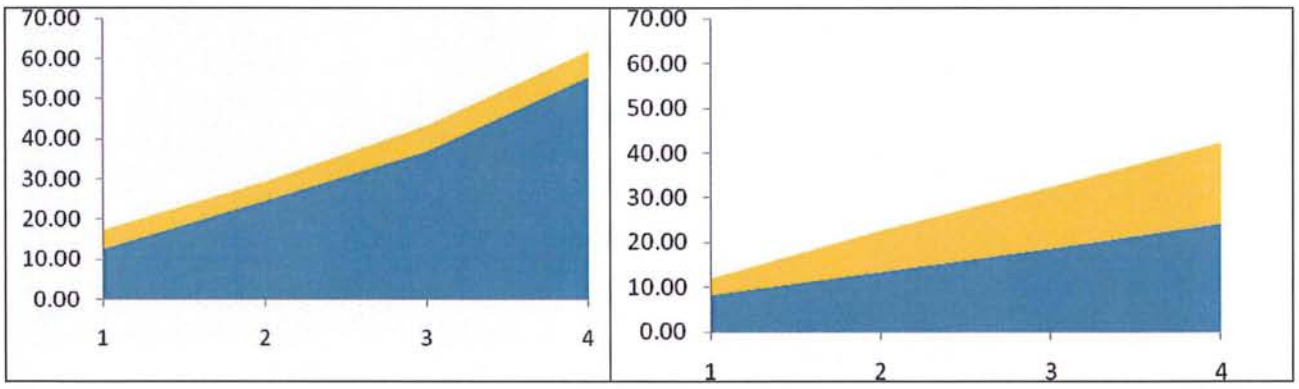


Figure 76 : Production moyenne totale cumulée de biodépots par individus du stand non toxique (à gauche) et toxique (à droite) pour les quatre jours de contamination, avec le détail de la production de fèces (en bleu) et de pseudo—fèces (en jaune).

Comme dans les précédentes expériences, le taux de parasitisme à *P. olseni* n'a pas été impacté par l'exposition à *A. ostenfeldii*. Néanmoins, chez de nombreux individus, le niveau d'intensité de la perkinsose dépassait les 100 000 cellules, seuil au-dessus duquel on peut s'attendre à des effets sur les palourdes (§ 2.2.4).
Compte tenu des réponses écophysiologiques observées, une attention plus particulière a été portée sur l'état des tissus de la glande digestive (analyses histologiques, **Figure** 77).

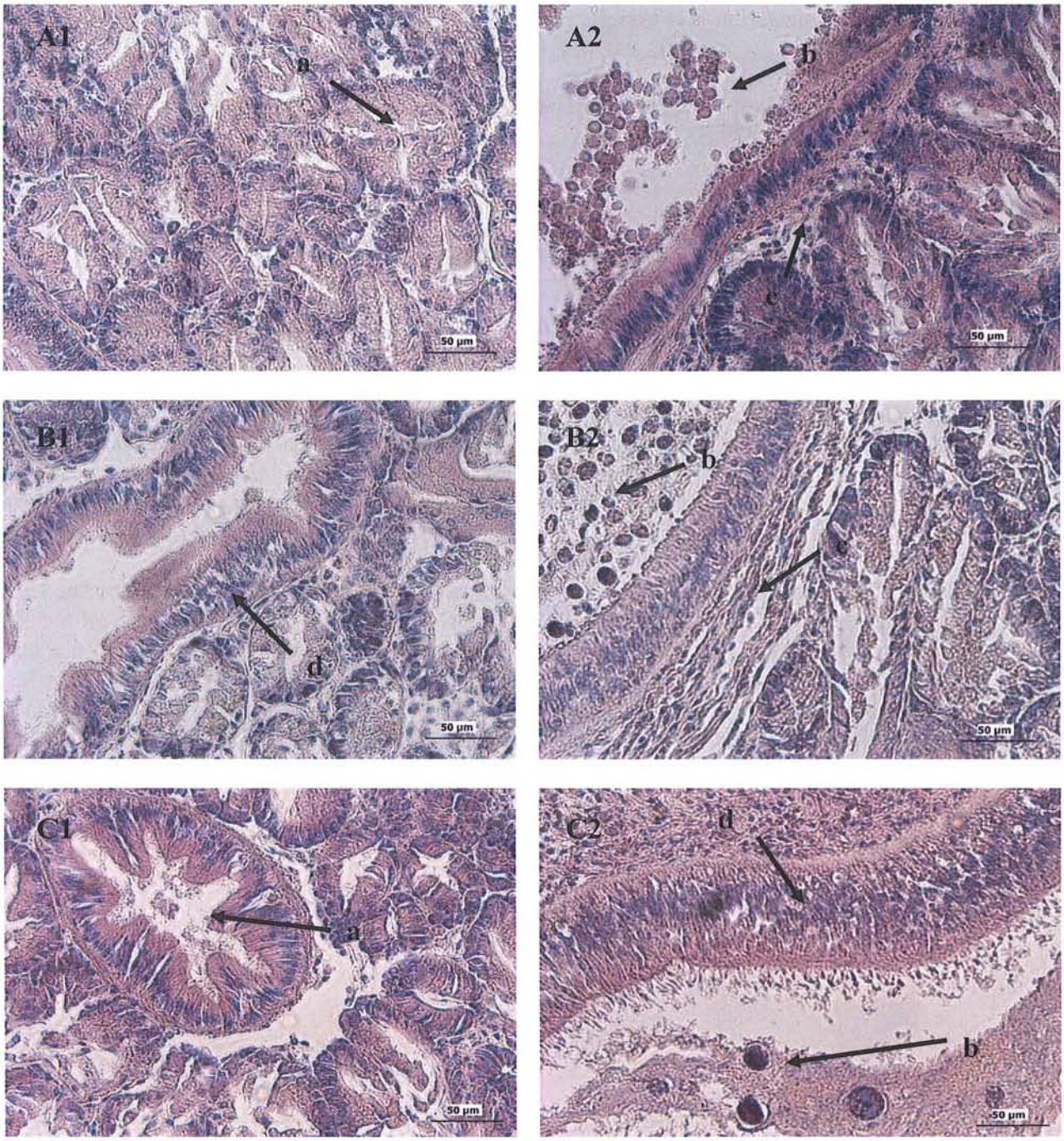


Figure 77 : Observations microscopiques des différents caractères étudiés chez les différents groupes (A : standard, B : non-toxique et C : toxique). (1) observation des tubules digestifs contenus dans la glande digestive et (2) observation de l'intestin. Les caractères observés pour cette étude sont a. l'état et le diamètre interne des tubules digestifs, b. la présence de particules alimentaires dans l'intestin, c. les infiltrations hémocytaires au niveau du tissu interstitiel et d. la diapédèse d'hémocytes à travers l'épithélium intestinal.

Les individus nourris avec de l'*A. ostenfeldii* présentent des tubules digestifs avec une lumière plus grande et moins bien délimitée que celle des tubules digestifs des animaux nourris avec *H. triquetra*. Cela pourrait indiquer un arrêt ou tout au moins une réduction de l'alimentation (Medhioub, 2011). Cependant, en comparaison avec l'expérience n°1, on n'observe pas de desquamation des tubules digestifs. Pour l'ensemble des individus, on observe une forte

infiltration hémocytaire au niveau de la glande digestive notamment au niveau des tissus interstitiels entourant l'estomac ainsi que des diapédèses d'hémocytes à travers l'épithélium intestinal. Ces observations sont en accord avec celles faites au cours des précédentes expériences mais les différences par rapport aux témoins semblent moins nettes. La durée de contamination expérimentale plus courte (4 jours au lieu de 7) peut sans doute expliquer cette différence.
Enfin, les activités enzymatiques digestives (amylase, laminarinase, cellulase) n'ont pas été significativement affectées par l'exposition à *A. ostenfeldii*.

4.2.2.3 Conclusion

En conclusion, l'exposition des palourdes à des efflorescences de phytoplancton toxique peut avoir des effets très différents en fonction de l'espèce de phytoplancton toxique considérée. En effet, une exposition des palourdes *R. philippinarum* à la diatomée toxique *Pseudo-nitzschia* sp. ne semble pas entrainée de fortes modifications physiologiques malgré l'accumulation de phycotoxines, l'acide domoïque. En revanche, une exposition au dinoflagellé toxique *Alexandrium ostenfeldii*, producteur de spirolides et qui « bloom » de façon récurrente dans le bassin d'Arcachon a des effets plus prononcés sur la physiologie des palourdes, provoquant en particulier des modifications métaboliques, ainsi que de nombreuses lésions au niveau tissulaire. Ces impacts négatifs de l'exposition à *A. ostenfeldii* peuvent ainsi avoir des effets sur la population de palourdes les rendant potentiellement plus susceptibles aux pathogènes ou prédateurs.

4.2.3 Impact combiné des contaminants métalliques et des algues toxiques

Cette expérimentation visait à croiser l'effet du Cd et des microalgues toxiques sur les palourdes en fonction de la charge en *Perkinsus* des individus (Abraham 2012).

4.2.3.1 Méthodologie

Dans cette expérience un lot de palourdes a subi une exposition combinant algues toxiques, *Alexandrium ostenfeldii* (AOST) et cadmium (Cd). Cinquante-six palourdes naturellement infestées par *Perkinsus* ont été prélevées en février 2012 à la station 16. Ces palourdes ont été réparties dans 2 UE (V=17L) alimentées en continu en eau de mer (35 mL/min) en conditions contrôlées (T= 14.7±0.3°C ; S=32.08 ±0.22 ‰, pH= 7.9 ±0.05). Après une phase d'acclimatation de 10 jours durant laquelle les palourdes ont été nourries par des apports d'algues en continu (*Heterocapsa triquetra* -HT- maintenu à $3.5.10^5$ cellules/L), une des deux UE a été simultanément contaminée en Cd (15 µg/L) et en AOST (4.10^4 cellules/L) pendant 4 jours. A l'issue de cette période de contamination, les conditions initiales sont restaurées et maintenues constantes les 10 jours suivant (**Figure 78**).

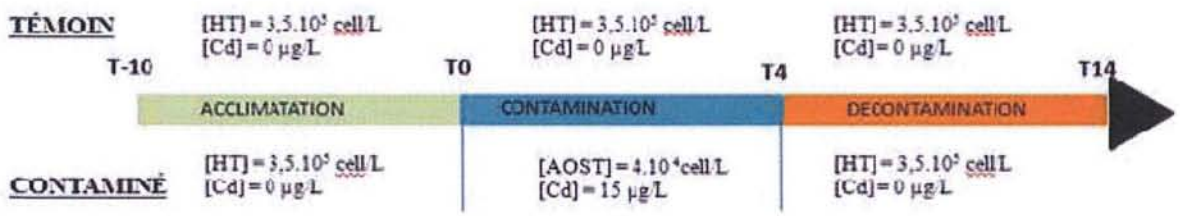


Figure 78 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

Des palourdes ont été prélevées à T0 (8/UE), T4 et T14 (10/UE), disséquées (branchies, glande digestive, reste du corps) puis analysées (concentration en AOST et en Cd, MT, réponses génétiques, réponses immunitaires, abondance parasitaire).

4.2.3.2 Résultats et discussion

La concentration en spirolides a été mesurée dans la glande digestive des organismes exposés à AOST (**Tableau 18**).

Tableau 18 : Toxicité en µg/kg de glande digestive (GD) des deux types de toxines retrouvés dans les palourdes en fonction des conditions et des temps de prélèvements.

		Toxicité en µg/kg de GD	
		SPX13,desmethyl-C	SPX13,19-didesmethyl-C
		Moyenne ± ES	Moyenne ± ES
T4	Témoin	<LD	<LD
	Contaminé	530 ± 320	350 ± 110
T14	Témoin	<LD	<LD
	Contaminé	120 ± 40	90 ± 30

Limite de détection (LD) = 5 µg/kg de GD

Chez les individus témoin la concentration en spirolides est en deçà des limites de détection. En revanche, chez les organismes exposés à AOST on note une présence significative de spirolides. Après 10 jours de décontamination (T14) les concentrations de spirolides ont significativement diminué dans les glandes digestives des palourdes.

La concentration en AOST utilisée pendant la phase d'exposition (4.10^4 cellules/L) est comprise dans la gamme des concentrations mesurées dans le bassin d'Arcachon ($1,7.10^3$ cellules/L en 2000 ; 2.10^3 cellules/L en 2006), toutes espèces *d'Alexandrium* confondues (REPHY, Ifremer). En revanche, des concentrations plus élevées sont retrouvées sur les côtes françaises lors de blooms phytoplanctoniques ($1.5.10^6$ cellules/L dans le bassin d'Aven en 2001). Nos conditions d'exposition à AOST ont permis de retrouver dans la glande digestive une concentration de SPX 13,desméthyl-C (0.53 ± 0.32 µg/g) similaire à celle retrouvée (0.40 ± 0.20 µg/g) dans une précédente étude dans laquelle, des palourdes étaient exposées à un mélange Isochrysis /AOST avec AOST à une concentration 250 fois supérieure (Lassudrie-Duchesne, 2011). La présence de ces spirolides dans les glandes digestives de *R. philippinarum* montre que les algues sont absorbées, accumulées et digérées et qu'elles pourraient donc affecter l'état de santé des organismes. Malgré une durée de décontamination relativement courte (10 jours), la concentration en toxines chute d'un facteur 5 par rapport à la concentration en fin de phase d'exposition (d'un facteur 2 pour 7 jours dans l'étude de Lassudrie-Duchesne 2011). Des études ont montré que la glande digestive est l'organe qui détoxique le plus rapidement les toxines algales, par la production de fèces, suivie des branchies et du muscle adducteur (Bricelj et Cembella, 1995) et que le principal mécanisme de détoxication chez *R. philippinarum* est l'excrétion (Oshima et Narita, 2001). Ces cinétiques de détoxication relativement rapides permettent de comprendre les réouvertures à la vente des coquillages survenant plusieurs jours après une détection d'algues toxiques.

La **Figure 79** présente la variation de la concentration en Cd dans les branchies, les glandes digestives et le reste du corps des palourdes au cours du temps pour les différentes conditions d'exposition.

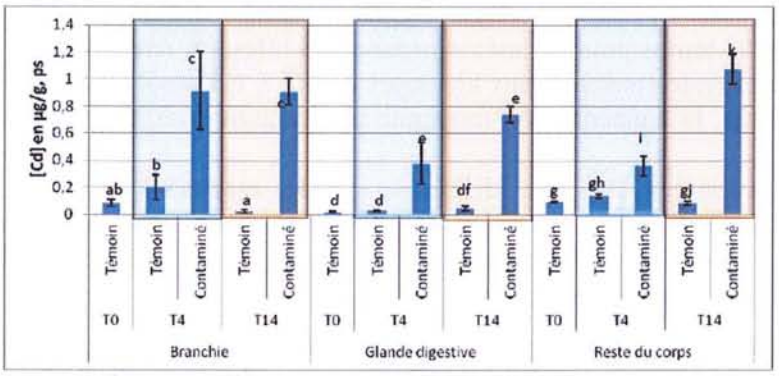


Figure 79 : Bioaccumulation du Cd dans les branchies, la glande digestive et le reste du corps de *Ruditapes philippinarum* pendant les phases de contamination (zones bleutées) et de décontamination (zones rosées). Les statistiques présentées montrent les différences entre les conditions témoin/contaminée (moy ± ES). Test de Mann et Whitney, seuil de significativité p< 0,05.

A T4 et à T14 les concentrations en Cd dans les organes ont significativement augmenté par rapport aux valeurs mesurées chez les témoins (branchies : ×4.5 et ×40 ; glande digestive : ×13 et ×15 ; reste ×2.5 et ×12 à T4 et T14 respectivement). Ceci témoigne de la forte capacité bioaccumulatrice des palourdes. Les valeurs d'accumulation à T4 et à T14 dans les branchies et la glande digestive des organismes contaminés ne sont pas différentes (pas d'augmentation avec le temps) contrairement au reste du corps. Comparativement aux deux études précédentes (§4.2.1), ces valeurs d'accumulation sont plus faibles, probablement du fait d'une période d'exposition plus courte (4 jours *versus* 7).

Contrairement aux toxines, la durée de décontamination n'est pas suffisante pour détoxiquer les organismes en Cd. Chez le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*, Arini (2011) montre que le temps de demi-vie du Cd varie de 170 à 250 jours suivant la saison (Automne/Printemps). Chez l'huitre *Crassostrea gigas*, Geffard *et al* (2002) rapportent des valeurs de demi-vie du Cd de 86 à 251 jours. Dans le cadre du projet REPAMEP, cette phase de décontamination visait principalement à suivre un éventuel impact sur la présence du protozoaire *Perkinsus*.

La **Figure 80** présente la variation de la concentration en MT dans les branchies et la glande digestive de *R. philippinarum* suivant les conditions expérimentales au cours du temps.

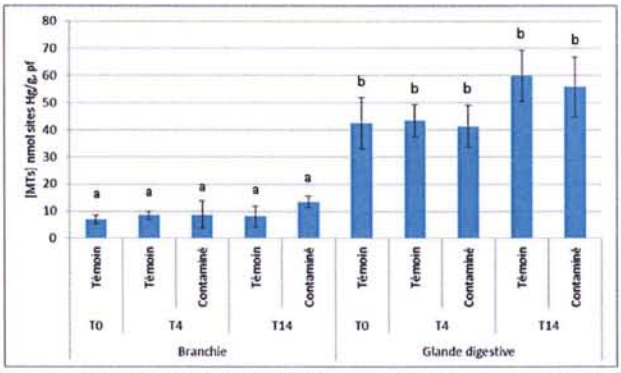


Figure 80 : Concentrations en MT dans les branchies et la glande digestive de *Ruditapes philippinarum* pendant les phases de contamination (T4) et de décontamination (T14). (moy ± ES). Test de Mann et Whitney, seuil de significativité p< 0,05.

Les concentrations en MT ne sont pas significativement différentes entre les conditions et entre les différents temps pour un même organe. En effet, on remarque que la concentration dans les branchies reste constante aux alentours de 9,1 ± 1,3 nmol sites Hg/g poids frais Dans la glande digestive, la concentration moyenne oscille autour de 48,7 ± 2,6 nmol sites Hg/g, poids frais.

Ces concentrations en MT sont identiques à celles mesurées lors des expositions au Cd seuls (§4.2.1) et semblent être suffisantes pour faire face à une contamination en Cd de 15µg/L. Dans nos conditions d'exposition, il ne semble pas y avoir d'effet de l'algue toxique *A. ostenfeldii* sur la concentration en MT.

Pour étudier la réponse génétique des palourdes face à cette exposition combinée Cd/AOST l'expression de 11 gènes d'intérêt a été suivie par Q-PCR, par comparaison avec un gène de référence (*ßactine*). Ces gènes sont impliqués dans diverses fonctions métaboliques telles que :

- La détoxication des métaux (gène de la métallothionéine, *mt*)
- La métabolisation de xénobiotiques (gènes *cyt p450* et glutathione S-Transferase sous-unité oméga *gst ω*).
- Les ABC transporteurs, capables d'expulser les xénobiotiques hors de la cellule (gène MultiXenobiotic Resistance *mxr*)
- Le métabolisme oxydatif (gènes de la superoxyde dismutase mitochondriale, *sod (Mn)*, et de la catalase *cat*)
- Le métabolisme mitochondrial (gènes *coxI* et 12s)
- La réparation de l'ADN (gène *gadd 45*)
- Les mécanismes apoptotiques (gène *bax*)
- L'horloge biologique (gène *per*).

L'expression génétique à T0 indique le niveau d'expression basal dans les branchies et la glande digestive (**Tableau 19**).

Tableau 19 : Niveau basal de l'expression génétique des 11 gènes étudiés chez la palourde

n=8	Branchie	Glande digestive
sod	0,056 ± 0,015	0,042 ± 0,004
cat	0,045 ± 0,010*	0,011 ± 0,001*
coxI	5,513 ± 0,848*	1,451 ± 0,262*
12s	20,985 ± 6,830*	6,372 ± 2,481*
mt	1,060 ± 0,219*	6,974 ± 1,796*
mxr	0,013 ± 0,009*	0,035 ± 0,006*
gadd 45	0,037 ± 0,009*	0,019 ±0,002*
bax	0,009 ± 0,004	0,002 ± 0,001
per	0,006 ± 0,015*	0,336 ± 0,055*
cyt p450	0,037 ± 0,015	0,032 ± 0,598
gst	0,078 ± 0,024	0,016 ± 0,534

Test de Mann et Whitney, seuil de significativité $p < 0,05$*

De manière générale, les niveaux d'expression des gènes étudiés sont plus élevés dans les branchies (sauf pour *mt*, *mxr* et *per*).

A T4 et T14 les niveaux d'expression des gènes sont normalisés par rapport au témoin (**Tableau 20**).

Tableau 20 : Facteur d'expression des 11 gènes étudiés chez *la palourde*

			Facteur d'induction ou de répression génétique par rapport au témoin	
	Fonction	gène	T4	T14
			[Cd]=15 µg/L [AOST]=4.10^4 cell/L	[Cd]=0 µg/L [HT]=3.5.10^5 cell/L
Branchies	Stress oxydant	*sod*	0.326	/
		cat	/	2.955
	Métabolisme mitochondrial	*cox 1*	6.795	7.543
		12s	0.007	/
	Détoxication	*mt*	3.94	7.871
		mxr	4.501	3.958
	Réparation de l'ADN	*gadd 45*	0.335	3.629
	Apoptose	*bax*	/	6.473
	Horloge biologique	*per*	2.713	/
	Métabolisation des xénobiotiques	*cyt p450*	7.767	0.199
		gst	6.744	/
Glande digestive	Stress oxydant	*sod*	/	/
		cat	2.717	7.619
	Métabolisme mitochondrial	*cox 1*	12.582	/
		12s	3.806	4.438
	Détoxication	*mt*	3.43	/
		mxr	/	/
	Réparation de l'ADN	*gadd 45*	/	4.927
	Apoptose	*bax*	0.08	/
	Horloge biologique	*per*	2.738	4.654
	Métabolisation des xénobiotiques	*cyt p450*	14.375	0.165
		gst	4.332	0.039

/ : identique au témoin

Les résultats sont surexprimés (>2) ou réprimés (<0,5) par rapport au gène *βactine*, gène de référence. (Les valeurs moyennes sont représentées)Test de Mann et Whitney, seuil de significativité p< 0,05

Dans les branchies, après 4 jours d'exposition combinée Cd+AOST, on observe une surexpression du gène *coxI* (métabolisme mitochondrial) et une surexpression des gènes impliqués dans l'élimination (*mt, mxr*) et la métabolisation (*cyt p450, gst*) des xénobiotiques. Au terme de la période de décontamination, *coxI*, *mt* et *mxr* conservent de forts taux d'expression alors que les expressions de *cyt p450* et *gst* reviennent à leur niveau de base. Les mécanismes de réparation de l'ADN sont sollicités (surexpression de *gadd 45*) et un stress oxydant est induit (surexpression des gènes *cat* et *bax*).

Dans la glande digestive, pendant la période d'exposition, on observe une surexpression de *cat* (stress oxydant) et une surexpression des gènes du métabolisme mitochondrial. Les mécanismes de détoxication et de métabolisation des xénobiotiques sont sollicités (surexpression de *mt, cyt p450 et gst*). Le mécanisme apoptotique est lui réprimé.

Après la période de décontamination, on observe que *mt* (détoxication) revient à un niveau de base. On remarque aussi que les gènes de la métabolisation des xénobiotiques (*cyt p450, gst*) sont réprimés. Les mécanismes de réparation de l'ADN sont sollicités avec la surexpression de *gadd 45*. Des gènes du métabolisme mitochondrial et du stress oxydant restent surexprimés (*12S* et *cat*) alors que d'autres restent (*sod*) ou retrouvent un niveau basal (*cox*).

Stress oxydant

Dans nos conditions expérimentales, le gène *sod* est réprimé à T4 dans les branchies et identique au niveau de base dans la glande digestive (T4 et T14). Dans leur étude, Paul-Pont *et al.* (2010) mettaient en évidence une induction de *sod* chez des coques, *Cerastoderma edule*, exposées au Cd (15 µg/L). Cette induction disparaissait lorsque *C. edule* est parasité par le trématode *Himasthla elongata* : les auteurs proposaient une action antagoniste des 2 perturbateurs qui au final conduisait au maintien de l'expression de *sod* au niveau basal. Cette même approche pourrait être envisagée dans notre étude où la double exposition Cd/AOST ne provoque pas de surexpression de *sod*. De la même façon, on observe que le gène *cat* reste à

un niveau basal à T4 alors qu'il est induit (×3) dans les branchies à T7 lors de l'étude précédente (§ 4.2). AOST pourrait là aussi avoir un effet antagoniste sur l'expression de *cat*.

Mécanismes de détoxication

A T4, dans les branchies, les mécanismes d'élimination et de métabolisation des xénobiotiques sont mis en place. Ces mécanismes sont cohérents avec la présence accrue de Cd dans ces organes. Une induction de gènes d'ABC transporteurs tels que *mxr* a déjà été décrite chez d'autres bivalves tel que *Corbicula fluminea* (Achard-Jorris *et al.*, 2004) ou chez le poisson zèbre *Danio rerio* (Gonzalez *et al.*, 2006) en présence de Cd. Ces transporteurs membranaires seraient capables d'extruder des complexes Cd-glutathion et Cd-couplé à des polypeptides riches en cystéine afin d'éviter une accumulation trop importante de Cd dans les cellules.

Comme vu dans la précédente étude (**Tableau 20**) et par Paul-Pont (2010), bien que le gène *mt* soit induit, la concentration de MT ne varie pas dans les tissus. L'induction d'un gène ne s'ensuit pas systématiquement de l'augmentation de la concentration de la protéine codée par ce gène, des régulations traductionnelles pouvant avoir lieu.

Métabolisme mitochondrial

L'analyse génétique montre que la mitochondrie semble être une cible des xénobiotiques. En effet, dès T4 le gène *coxI* est induit dans les branchies et la glande digestive. Plusieurs études ont montré que le Cd peut inhiber l'activité de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale en induisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Wang *et al.*., 2004). De même, l'induction de *coxI* après contamination à des métaux traces a été corrélée à un mécanisme adaptatif afin de pallier aux atteintes mitochondriales sur le complexe IV de la chaine respiratoire (Gonzalez *et al.*, 2006 ; Achard-Jorris *et al.*, 2006a ; Cambier *et al.*, 2010). Ce mécanisme a pour but de maintenir l'intégrité du fonctionnement de la chaine respiratoire et ainsi permettre le maintien d'un pool d'ATP suffisant à la vie cellulaire, mais également à la lutte contre les effets des métaux traces.

Réparation de l'ADN et apoptose

Les gènes *gadd 45* et *bax* sont réprimés dans les branchies et restent à un niveau basal dans la glande digestive à T4. Cependant, leur expression est induite à T14. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Gonzalez *et al.* (2006) et Mouchet *et al.* (2006) qui reportent, dans un premier temps, une répression des systèmes de réparation de l'ADN et des voies apoptotiques lors d'expositions au Cd. La surexpression de ces gènes à T14, après arrêt de la contamination, montre que les mécanismes de réparation et apoptotiques sont à nouveau effectifs. La présence de l'algue toxique *A. ostenfeldii* pourrait également être à l'origine de ces inductions à T14.

Les paramètres immunitaires (THC et efficacité de la phagocytose) ont été mesurés dans l'hémolymphe des palourdes (**Figures 81 à 83**).

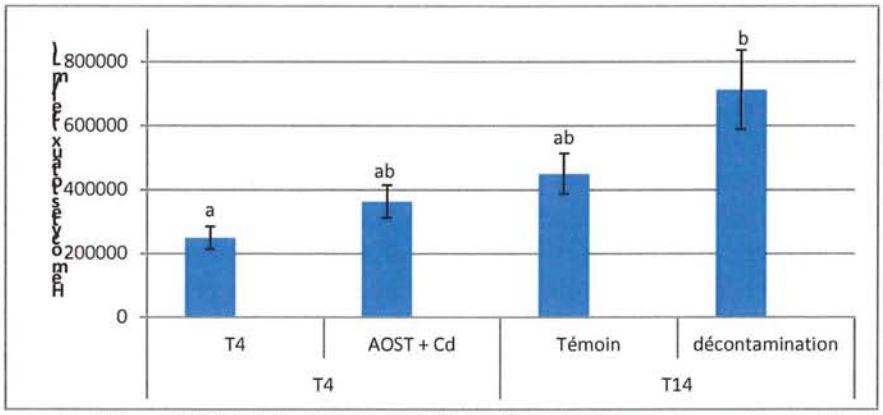


Figure 81 : Hémocytes totaux (THC : Total Hemocyte Count) après 4 jours de contamination Cd/AOST (T4) et 10 jours de décontamination (T14).

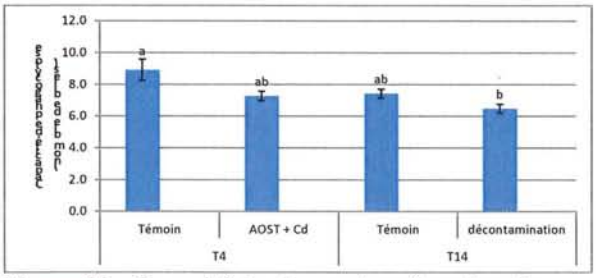


Figure 82 : Capacité de phagocytose (nombre de billes) après 4 jours de contamination Cd/AOST (T4) et 10 jours de décontamination (T14).

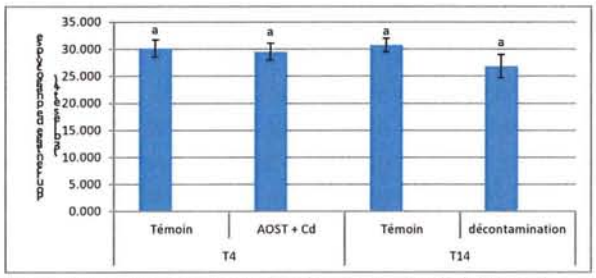


Figure 83 : Pourcentage de phagocytose (3 billes et plus) après 4 jours de contamination Cd/AOST (T4) et 10 jours de décontamination (T14).

Le nombre total d'hémocytes circulant et l'efficacité de la phagocytose (capacité et pourcentage) des palourdes témoin et contaminées ne diffèrent pas pour chaque temps expérimental. L'exposition combinée Cd/AOST n'entraine pas de modifications de ces paramètres immunitaires. Ces réponses immunitaires ne semblent pas non plus corrélées à la charge parasitaire en *Perkinsus* : l'analyse des valeurs individuelles montrent que les individus les plus chargés en parasites ne présentent pas les taux de réponses les plus forts.

Le dénombrement des *Perkinsus* dans les branchies des palourdes est présenté **Figure 84**. Comme précédemment (§ 4.2.1.2), le nombre d'hypnospores est extrêmement variable entre les individus (de 0 à $6{,}9.10^6$ cellules de *Perkinsus* / g de branchies) et un seul individu (condition de décontamination à T14) sur les 56 étudiés présente un nombre de *Perkinsus* supérieur à 10^6 cellules/g de branchie. L'abondance parasitaire moyenne ne varie pas en fonction des conditions expérimentales.

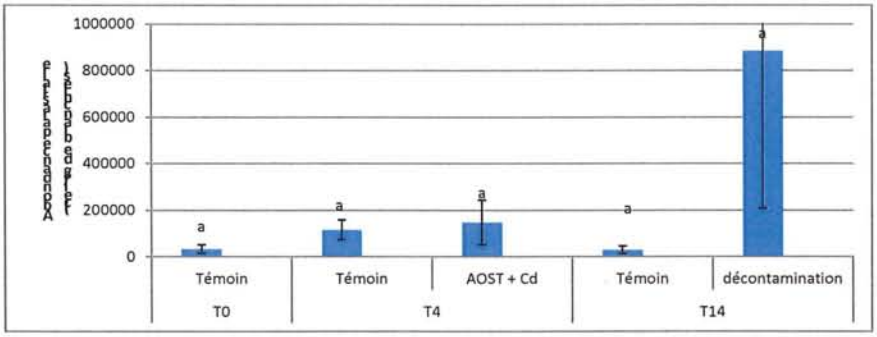


Figure 84 : Abondance parasitaire (cellules de Perkinsus/g de branchie) des palourdes dans les différentes conditions expériemntales.

4.2.3.3 Conclusion

Les palourdes exposées 4 jours au Cd et au dinoflagellé *A. ostenfeldii* ont accumulé significativement les 2 contaminants dans leurs organes (B, GD et R pour Cd ; GD pour AOST). Après 10 jours de dépuration, les concentrations en spirolides retrouvent leur valeur initiale alors que le Cd reste bien présent dans les organes. Nos premières analyses semblent montrer que la présence du parasite *Perkinsus* ne modifie pas l'accumulation de Cd dans les organes ni les réponses en MT, expressions génétiques et réponses immunitaires. Les valeurs individuelles devront être étudiées avec soin afin de confirmer ces résultats. Les analyses biochimiques (ATP, MDA : analyses en cours) permettront également de finaliser cette étude combinant plusieurs stress.

Si l'impact de l'effet combiné de microalgues toxiques et de Cd n'a pu être encore traité au niveau du comportement valvaire, des expériences menées en simple stress (§4.2) permettent de dégager certaines conclusions.

Pour l'effet du cadmium chez les palourdes nourries avec des algues non toxiques, nous avons pu mettre en évidence que le rythme circadien disparaissait lors d'une exposition à 15 µg/L de Cd et que lors de la phase de récupération (sans Cd), le rythme reste perturbé, il s'est allongé avec une période statistique de 27.3 h au lieu de 24 h. Enfin, nous avons mis en évidence une corrélation au niveau individuel entre la bioaccumulation du Cd dans la glande digestive et la durée d'ouverture valvaire, ce qui peut s'expliquer, sachant que le Cd est adsorbé sur les algues filtrées par la palourde, par le fait que la glande digestive est l'organe cible de la contamination par voie trophique.

5 Développement – Amélioration – Optimisation des outils et des méthodes d'analyse

(Tâche 4 : G. Le Croizier, P. Soudant, C. Binias, M. Bunel, **H. Hégaret*, P. Lassus***, **C. Lambert***)

Le projet a été mis à profit pour développer, améliorer, optimiser différents marqueurs et indicateurs de l'état de santé des palourdes et de détection des pathogènes. Dans la mesure du possible, ces nouvelles méthodologies ont été inclues dans les suivis et les expérimentations mises en œuvre. Cela concerne des outils faisant appel à l'éthologie, l'écophysiologie, l'immunologie, la biologie cellulaire, la biologie moléculaire, et la biochimie.

Mesure de l'activité d'enfouissement des palourdes

La mesure de l'activité d'enfouissement a été mise au point par Gaël Le Croizier, lors de son stage de Master 1, à l'aide d'une structure constituée de tubes de PVC surmontant les bacs d'exposition, permettant ainsi la fixation d'une caméra, elle-même reliée à un ordinateur (**Figure 85**). Ce dernier est équipé d'un logiciel permettant la programmation de prises de photos (Captureflux®), à intervalle de temps et pour une durée variables, offrant ainsi une possibilité de suivre l'enfouissement des animaux sans la présence obligatoire de l'expérimentateur. L'enfouissement des palourdes déposées à l'horizontal à la surface du sédiment est ainsi suivi tout au long de l'expérimentation. Le suivi par ordinateur est assuré par la prise automatique (grâce au logiciel Captureflux®) d'une photo des bacs toutes les 10 minutes, et ceci sur la durée totale de l'expérience. Les images sont ensuite organisées grâce au logiciel Virtualdub®, et analysées pour en déduire le pourcentage d'enfouissement par bac en fonction du temps (rapport palourdes enfouies sur non-enfouies), l'heure d'acquisition étant indiquée sur chaque photo. Un individu est considéré comme enfoui dès qu'il se retourne en position verticale, umbo vers le haut.

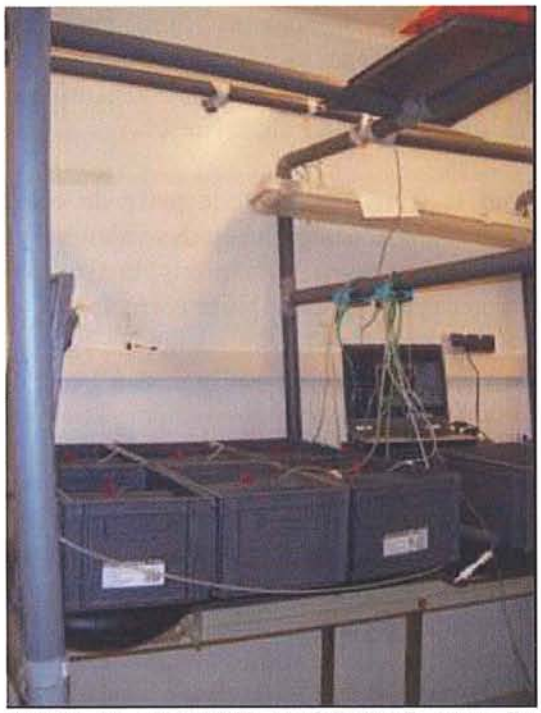


Figure 85 Dispositif expérimental pour les manipulations sur l'enfouissement comprenant les bacs disposés sur la paillasse, le circuit d'oxygénation et la caméra reliée à l'ordinateur.

Mesures des activités enzymatiques digestives

La mesure, sur extrait de palourdes, de l'activité de trois enzymes digestives - amylase, cellulase, laminarinase –a été développée et mise en place par Mélanie Bunel dans le cadre de son stage de Master 1.

---

* Principal rédacteur

La mesure des activités enzymatiques repose sur la mise en présence de l'échantillon biologique contenant l'enzyme avec son substrat spécifique (respectivement amidon, cellulase et laminarine). Les mesures des activités enzymatiques ont donc été adaptées de la méthode de Bernfeld (1955), qui mesure l'activité de l'enzyme par l'apparition des produits de dégradation de la réaction enzymatique. Pour mesurer l'activité spécifique enzymatique dans les glandes digestives, Mélanie a due déterminer les dilutions, températures et durées d'incubation pour chaque enzyme digestive. Les analyses ont donc été effectuées à 37°C suite à une incubation de 30 min pour l'amylase et d'une heure pour la cellulase et la laminarinase. Enfin, les dilutions de travail établies et utilisées dans cette expérience d'exposition de palourdes aux microalgues toxiques sont respectivement de 1/20, 1/2 et 1/4 pour l'amylase, la cellulase et la laminarinase. Le choix des dilutions a permis d'utiliser un minimum de matériel biologique pour une réponse enzymatique interprétable.

Mesures des paramètres hémocytaires sur des échantillons fixés.

La principale contrainte concernant les mesures des paramètres hémocytaires par cytométrie est qu'elles doivent se faire sur des échantillons frais. Néanmoins, dans certaines expérimentations, ce n'est pas possible et il était donc essentiel de pouvoir proposer quelques mesures alternatives sur des échantillons fixés. Plusieurs essais avec différents fixateurs (formol 3% ; glutaraldéhyde 1%) et différentes durées de stockages (1 et 4 semaines) ont été réalisés.
Pour le dénombrement, la perte de cellules (de 40 à 80%) entraînée par la fixation rend impossible la comparaison des valeurs de concentration (THC) observées sur cellules fraîches et cellules fixées. Néanmoins, la fixation au formol 3%, stockage 1 semaine (4°C au noir) permet une reproductibilité correcte des variations interindividuelles. Il paraît aussi important de limiter la durée de stockage à ~2 semaines puisque la baisse du nombre de cellules fixées semble se poursuivre entre 1 et 4 semaines de stockage, même si elle est moins rapide que durant la 1ère semaine.
Le taux de phagocytose (% de cellules actives) et la capacité de phagocytose (nombre de billes par hémocyte actif) ne sont pas modifiés par la fixation (formol ou glutaraldéhyde) et ce même après 4 semaines de stockage à 4°C. Malgré la perte des cellules due à la fixation, la fixation au glutaraldéhyde 1% donne globalement de meilleurs résultats.
Une estimation de la variabilité de l'analyse par cytométrie en flux a été réalisée en dénombrant les hémocytes présents dans un seul et même échantillon 21 fois consécutives par cytométrie (vortex rapide entre chaque analyse). Les résultats montrent un intervalle de confiance (alpha = 0,05) de ± 2,26% autour de la moyenne. Les valeurs minimales et maximales varient respectivement de -11% à + 6% autour de la moyenne. Il paraît donc raisonnable de ne pas considérer différents deux dénombrements réalisés au cytomètre s'ils n'ont pas 5 à 10% de différence.
A l'issu des essais de fixation et de stockage il apparaît évident que l'utilisation de cellules fixées pour la mesure des paramètres hémocytaires est possible mais ne permet pas « d'égaler » l'analyse sur cellules vivantes.

Culture d'*A. ostenfeldii* en batch et en photobioréacteur et caractérisation de sa production toxique en spirolides

Avant de réaliser des expérimentations de contamination des palourdes, il était nécessaire de produire *A. ostenfeldii* en grande quantité avec un contenu toxinique maîtrisé. Pour cela, la croissance, le quota toxinique par cellule et le profil toxinique d'*A. ostenfeldii* ont été évalués selon i) différentes conditions de température, ii) différentes compositions de milieu de culture, et iii) deux modes de cultures (batch vs photobioréacteur).

La croissance d'*A. ostenfeldii* est significativement modulée par la température. A la fin de la phase exponentielle, les concentrations en cellules sont significativement plus fortes à 16°C qu'à 22°C (**Figure 86**). Par contre, la composition du milieu (L1, f/2, et L1 supplémenté avec de l'extrait de sols) n'a pas ou peu d'influence sur le taux de croissance d'*A. ostenfeldii* (**Figure 87**).

Evaluation de la charge en *Perkinsus* totale dans les palourdes par rapport à leur concentration dans les branchies.

Cf § 2.1.1.

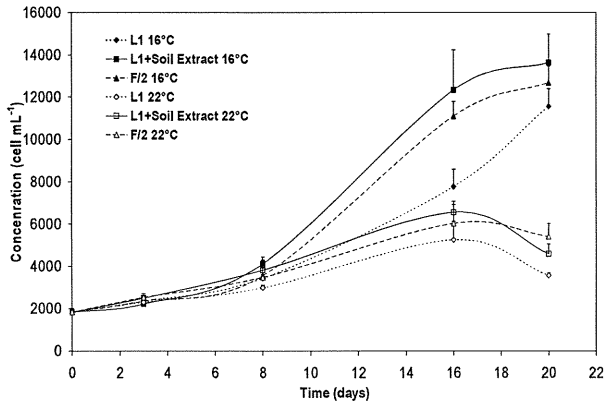


Figure 86 : Impact de la température et de la composition du milieu sur la croissance d'*A. ostenfeldii*

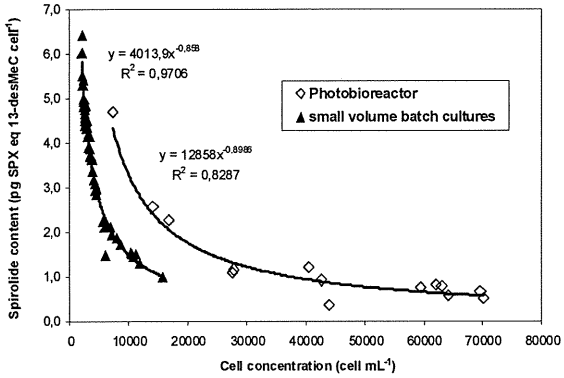


Figure 87 : Quota cellulaire en spirolides (exprimé en pg SPX 13-desMec eq cell^{-1}) en fonction de la concentration cellulaire.

En termes de contenu en spirolides (SPX), les plus forts quotas cellulaires (env. 5pg SPX 13-desMec eq cell^{-1}) sont observés pendant la phase de latence de croissance pour toutes les conditions testées en batch. Ensuite, ce quota cellulaire en spirolides est négativement et significativement corrélé à la concentration en cellules de la culture selon l'équation $y=4013.9x^{-0.858}$ (**Figure 87**). Les profils toxiniques obtenus dans ces cultures sont dominés par la 13,19-didesMeC (29-46%), suivie par la SPX-D (21-28%), la 13-desMeC (21-23%), et la 13-desMeD (17-21%).

Une croissance d'*A. ostenfeldii* stable a pu être obtenue en photobioréacteur pendant plus de 2 mois avec une concentration maximale atteignant 7 x 10^4 cell mL^{-1}. Comme dans les cultures en batch, les quotas cellulaires en spirolides les plus forts sont observés pendant la phase de latence et ensuite diminuent régulièrement pendant la phase exponentielle. Ce quota cellulaire en spirolides est en fait négativement corrélé à la concentration cellulaire selon l'équation $y=12858x^{-0.8986}$ (**Figure 87**). Dans le photobioreacteur, le profil toxinique se caractérise par une forte proportion de 13,19-didesMeC (60-87%) et de faibles proportions en SPX-D (3-12%) et 13-desMeD (1.6-10%) se distinguant ainsi des profils obtenus en batch.

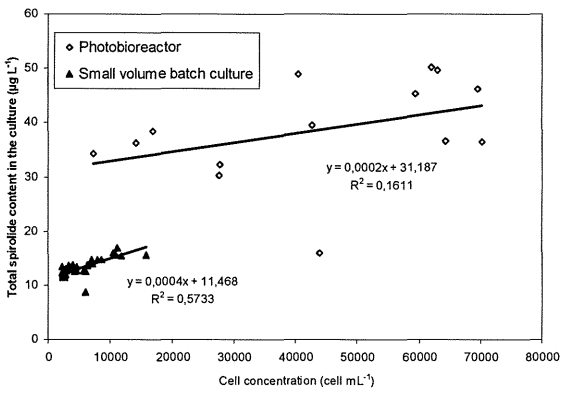


Figure 87 : Concentration en spirolides par litre de culture (µg L^{-1})

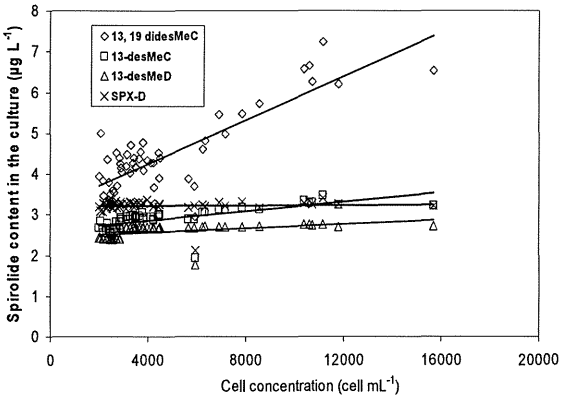


Figure 88 : Concentration des analogues des spirolides par litre de culture (µg L^{-1}).

Les concentrations en spirolides exprimées par litre de culture ne progressent que faiblement dans la croissance d'*A. ostenfeldii* y compris pendant la phase exponentielle (**Figure 88**). L'essentiel de la synthèse des spirolides semble se faire au moment de l'inoculum et/ou pendant la phase de latence. Ensuite, seule la 13,19-di-desMeC est produite en phase exponentielle que ce soit pour des cultures en batch (**Figure 88**) ou en photobioréacteur.

6 La vision du Comité des Pêches

(A. Khayati)

(Remarque : les deux interlocutrices du CRPMEM initialement pointées dans le projet (A. Lecanu et M. Peyreblanque) ont quitté le CRPMEM Aquitaine en 2010, le projet REPAMEP a été ensuite suivi alternativement par C. Jabouin (CRPMEM Aquitaine), C. Laffitte (CDPMEM 33) et A. Khayati (CRPMEM Aquitaine - CDPMEM 33)

Cinquante-sept licences de pêche permettant d'exploiter les palourdes dans le bassin d'Arcachon sont délivrées chaque année par le Comité Régional des Pêches Maritimes et des Elevages Marins d'Aquitaine (CRPMEM Aquitaine), en partenariat étroit avec le Comité Départemental des Pêches Maritimes et des Elevages Marins de la Gironde (CDPMEM 33). Cette pêche concerne une centaine de marins-pêcheurs (jusqu'à deux pêcheurs par licence). Les palourdes représentent le second tonnage débarqué par les navires de pêche intra-bassin en 2011, avec 613 043 kg déclarés (Source : Base Pêche Aquitaine du CRPMEM Aquitaine). Elles sont pêchées à marée basse sur l'estran : il s'agit de pêche à pied.

La palourde japonaise est donc une ressource halieutique de première importance pour les navires de pêche du bassin d'Arcachon. Les pêcheurs professionnels ont d'ailleurs mis en place depuis de nombreuses années des mesures de gestion et une coopération avec les organismes scientifiques compétents, principalement le laboratoire EPOC (Université Bordeaux 1-CNRS) et le LRHA Ifremer.
Les travaux de REPAMEP ont permis de poursuivre et renforcer cette dynamique qui rassemble professionnels et scientifiques autour de la connaissance sur la palourde du bassin, au travers des actions suivantes.

6.1 Suivi des résultats scientifiques de REPAMEP

L'acquisition de ces connaissances est un atout pour le CDPMEM 33 et le CRPMEM Aquitaine, car ce sont des éléments indispensables pour mieux comprendre la dynamique du stock de palourdes dans le Bassin. De ce fait, avec l'accompagnement des structures

scientifiques compétentes, ces connaissances ne peuvent que nous aider à améliorer la gestion de cette pêcherie.
Le suivi des résultats scientifiques par le CDPMEM 33 et le CRPMEM Aquitaine au travers d'échanges individuels ou lors de réunions de restitution, a porté en particulier sur les thématiques suivantes:

- avancée des connaissances sur les pathologies de la palourde du Bassin d'Arcachon (maladie du muscle marron, perkinsose);
- état des lieux des contaminations métalliques des palourdes dans le bassin d'Arcachon ;
- travaux sur *Alexandrium* et ses incidences sur la santé des palourdes ;
- travaux de microbiologie sur les communautés bactériennes associées aux palourdes.

6.2 Apports des travaux de REPAMEP pour les structures professionnelles

A l'heure où l'on se tourne de plus en plus vers une gestion écosystémique des pêches, et où de nouveaux outils de gouvernance comme le projet de « parc naturel marin du bassin d'Arcachon et son ouvert » sont en réflexion sur le territoire, des projets transdisciplinaires et d'approche intégrative comme REPAMEP nous sont essentiels. Ils nous aident à faire comprendre que la problématique « pêche » est bien plus complexe qu'une simple interaction entre une population halieutique et des prélèvements par la pêche. Il y a encore beaucoup de chemin à parcourir pour appréhender l'ensemble des facteurs impactant les populations halieutiques, et pour les intégrer dans la gestion des pêches.

Une restitution du programme aux professionnels est prévue, et sera organisée courant 2013. Elle permettra de porter à connaissance des pêcheurs de palourdes les résultats des travaux scientifiques qui peuvent répondre à leurs préoccupations (adaptation du contenu et du rendu aux problématiques concrètes rencontrées par les professionnels).

6.2.1 Renforcement des relations entre laboratoires scientifiques et structures professionnelles sur le bassin d'Arcachon

Certains partenariats ont pu être développés par le biais de REPAMEP, rapprochant ainsi les acteurs économiques et ceux de la recherche.
A titre d'exemple, le CDPMEM 33 a apporté son support technique dans le cadre des travaux sur les interactions entre palourdes et communautés bactériennes (Cf. 3.3.1), en mettant en relation le laboratoire EPOC et un établissement professionnel de purification des palourdes (société CODIMER) susceptible de disposer des infrastructures nécessaires pour le bon déroulement de l'expérimentation.
Ce type d'interactions concrètes a aussi été bénéfique pour le CDPMEM 33 : le laboratoire EPOC a pu prêter une benne Van Veen au CDPMEM 33 pour la réalisation de prélèvements dans le cadre de la campagne d'évaluation du stock de palourdes menée par le CDPMEM 33 en 2012.

6.2.2 Valorisation des travaux sur les pathologies et partenariats de travail

Concernant l'avancée des travaux sur la BMD : le laboratoire EPOC a participé à la campagne d'évaluation du stock de palourdes menée par le CDPMEM 33 en 2010 et en 2012. La collaboration a été bénéfique pour les deux structures, en particulier en 2012 : le laboratoire EPOC a fourni des moyens humains pour aider à la réalisation de la campagne et au traitement des résultats (présence à bord lors des prélèvements pour garantir le respect du protocole, comptage et mesure des palourdes prélevées, identification des palourdes atteintes de BMD, constitution du fichier de données) ; le CDPMEM 33 a donné accès à ces données au laboratoire EPOC pour enrichir les informations sur la prévalence de la BMD dans le Bassin.

En 2013, les pêcheurs professionnels de palourde souhaitent mettre en place une opération « test » de transplantation de palourdes au sein du bassin d'Arcachon : des palourdes seront prélevées dans le Sud-est du Bassin, et ressemées dans une réserve de pêche située au Nord-ouest. Lors du montage de l'opération, une question importante s'est posée : existe-t-il un risque de disséminer des pathologies dans le Bassin par le biais de cette opération de transplantation ? Grâce à la dynamique de travail entre les partenaires de REPAMEP et aux connaissances acquises lors du projet, le CDPMEM 33 a pu avoir une réponse rapide du laboratoire EPOC. Les pêcheurs professionnels ont pu poursuivre leurs réflexions sur le projet de transplantation, en disposant de connaissances récentes sur la répartition des pathologies intra-bassin.

7 Conclusion générale

7.1 Bilan

La question principale devant être abordée par ce projet était de répondre aux préoccupations des « pêcheurs » en complétant les données récentes existantes sur la population de palourde japonaise dans le bassin d'Arcachon, à la suite des travaux de Dang (2009) sur la dynamique des populations et l'inventaire/description des pathologies, de Paul-Pont (2010) sur les atteintes écotoxicologiques et les réponses adaptatives et de Caill-Milly (2012-thèse encore indisponible) sur la gestion des stocks et les anomalies biométriques, le tout dans le contexte d'un état des stocks plutôt inquiétant (Sanchez et al. en révision). Pour cela, les orientations du projet REPAMEP avaient été dirigées vers la continuation des recherches sur la pathologie émergente BMD, sur l'existence d'un microbiote spécifique associé, sur le risque encouru par les palourdes vis-à-vis des épisodes toxiniques (pour la première fois, la pêche à la palourde a été fermée en 2012 suite à un tel épisode qui est généralement restreint au moules et aux huîtres), le tout dans un contexte écotoxicologique plus large, comprenant notamment un bruit de fond à évaluer en termes de contamination métallique.

Cette conclusion générale va donc s'attacher (et se réduire), au vu des résultats du projet, à caractériser au mieux la population exploitable de palourde japonaise dans son contexte environnemental.

La palourde est principalement exploitée dans le domaine lagunaire correspondant au groupe « 3-4 » de notre étude, qui comprend 22 stations (**Figure 2**), dont 4 ont fait l'objet de suivis

intensifs que ce soit pour les maladies (station 8) ou les métaux-traces (stations 11, 16 et 29) (**Figure 4**). L'environnement (**Tableau** 1) est caractérisé par des sédiments de sables fins envasés (médiane granulométrique autour de 100 µm avec un taux de pélites autour de 30-40% et une teneur en matière organique autour de 6 à 9%) pouvant être recouverts à 40% d'herbiers à *Zostera noltii.* La densité de palourdes (2010) est ici la plus élevée avec 25-50 ind/m², quand elle ne dépasse pas les 20 ind/m² dans les zones plus océaniques ou plus proches des rivières.

Ces palourdes sont globalement dans un état de santé qualifié de moyen. Macroscopiquement, elles ont une taille excédant rarement 35, voire 30 mm, avec un indice de condition faible (IC=poids sec de chair mg / poids sec de coquille g) et variant peu dans l'année (signe d'un effort de reproduction modéré), autour de 30 (**Figure 11, Tableau 12**). En comparaison, un site comme Arguin peut abriter épisodiquement des palourdes de plus de 40 mm avec un IC deux fois plus élevé (**Tableau 12**). Comme l'avait noté Dang (2009), ce déficit de condition peut être lié à un régime trophique déficient en phytoplancton (**Figure 24**) et à de fortes prévalences en BMD (autour de 11% des adultes, § 2.1.2) et en perkinsose (parfois proche de 100%). Concernant la perkinsose, l'intensité moyenne chez les adultes est autour de 70 000 cellules/gPF branchie, ce qui paraît déjà suffisant pour ralentir la croissance (**Tableau 5**), et entraîner des désordres tissulaires (desquamation, vacuolisation, etc.) pouvant être exacerbés par la présence d'algues toxiques (§ 4.2.2.2). Il y a peu de variation saisonnière de l'intensité parasitaire (**Figure 6**) mais, nous situant juste au-dessous d'un seuil délétère évalué à 10^{-6} cellules/gPF branchie (§2.2.4, **Figure 10**), cette intensité peut être considérée comme préoccupante. Elle a largement justifié la prise en compte de ce paramètre dans les diverses expériences de contamination, la notion de système-parasite-hôte (SPH) prenant ici toute sa signification et dépassant la notion d'espèce hôte : c'est le SPH qui doit répondre aux agressions ponctuelles, étant donné que des palourdes saines de perkinsose sont une exception.

Les interactions entre BMD et perkinsose ne sont pas évidentes mais les deux maladies sont particulièrement prévalentes dans des environnements à renouvellement d'eau relativement faible, et sur des estrans souvent découverts (**Tableau 2**). Il semble que la perkinsose soit cependant un moteur important de la remontée des palourdes à la surface (pour ce qui concerne les pathologies) (**Figure 10**). Les palourdes se défendent « tièdement » par leur système immunitaire : le nombre total d'hémocytes n'est pas affecté (**Figure 12**), la capacité de phagocytose est augmentée chez les palourdes en surface (donc aussi les plus affectées par la perkinsose) (**Figure 13**), réponse exacerbée pour le % de phagocytose chez les palourdes atteintes de BMD (**Figure 14**). Contrairement à ce qui avait été observé dans des études antérieures mais avec d'autres espèces d'algues (Hégaret et al. 2007a, 2009), aucune interaction entre *P. olseni* et *A. ostenfeldii* n'a été observée (§ 4.2.2.2).

L'affaiblissement des palourdes par *P. olseni* ne semble pas avoir d'effet sur la contamination expérimentale métallique (Cd) (**Figure 56**). Cependant, le suivi des palourdes sur 2 années a révélé que la contamination chronique ne concerne pas uniquement le Cd (§ 4.1.1). Sur les 12 métaux dosés, et par rapport à des valeurs nationales à utiliser avec précaution car issues d'analyses sur d'autres espèces de bivalves, le nickel (Ni), le chrome (Cr), le cuivre (Cu) et le plomb (Pb) apparaissent plutôt au-dessus des valeurs médianes (aluminium et manganèse : présence, mais pas de possibilité de comparaison). Hormis le cuivre utilisé dans les peintures anti-salissures et le plomb dont la localisation nord bassin pourrait-être en lien avec d'anciennes activités de chasse ou de ball-trap, il est aujourd'hui prématuré d'interpréter ces valeurs qui restent globalement dans un intervalle « peu à pas pollué » hormis le nickel qui pose question.

Ayant évoqué précédemment la notion de SPH pour qualifier le superorganisme « palourde-*Perkinsus* », le projet REPAMEP a démontré qu'il était sans doute nécessaire d'étendre la réflexion aux communautés de procaryotes. Au-delà des études sur la diversité procaryotique

qui a notamment montré un appauvrissement de la diversité dans les palourdes par rapport à un « standard de bonne santé Arguin » (§ 3.2), nous avons mis en évidence l'existence d'une communauté de procaryotes inféodée à la palourde, en plus de la communauté en relation directe avec le sédiment environnant et principalement localisée dans l'appareil digestif. (§ 3.3).
La consultation du REPHY et l'analyse d'échantillons en 2010 et 2011 a révélé l'absence de toxines de type ASP, PSP et la présence de traces de spirolides (6-8 µg/kg). Cette présence suggérait que les palourdes du bassin d'Arcachon peuvent être confrontées à la présence d'algues toxiques comme *Alexandrium ostenfeldii.* Cette hypothèse est confortée par les dosages effectués lors des expériences de contamination qui ont révélé chez les palourdes témoins (ramassées dans le bassin d'Arcachon en février 2010 et nourries avec du plancton non-toxique) des concentrations de l'ordre de 25 µg/kg (**Figure 68**). Les valeurs de toxicité obtenues expérimentalement sont donc dans un ordre de grandeur qu'on pourrait attendre lors d'un évènement de bloom toxique (100 à 700 µg/kg selon situations, molécules concernées ou organes ciblés). Les atteintes histologiques sont assez nettes (infiltration hémocytaire, diapédèse, désquamation, etc.) (**Figure 70**) avec ponctuellement des réactions immunitaires (augmentation du THC, **Figure 72**) et des perturbations de l'activité alimentaire (**Figure 75, Tableau 17**). Sur la base d'une autre espèce d'algue toxique (*Pseudo-nitzschia multiseries*), des perturbations de l'activité valvaire, en pourcentage d'ouverture (**Figure 60**) comme en rythme (**Figure 62**), ont été enregistrées.
Une efflorescence toxique apparaissant dans un contexte de contamination métallique plus ou moins chronique, il était intéressant de tester expérimentalement l'effet conjoint métal/algue toxique sur la palourde. Cette expérience, complexe dans sa réalisation, a montré que les stress n'avaient pas la même dynamique. Le cadmium reste dans les organes (transfert des branchies vers la glande digestive, stimulation des défenses protéiques (métallothionéines) même après dépuration, là où les toxines (spirolides) retrouvent les valeurs plus faibles voire initiales (**Figure 79, Tableau 18**). Les marqueurs génétiques paraissent largement réactifs à cette double contamination (**Tableau 20**) alors que le système immunitaire réagit assez modestement, et uniquement en fin de phase de dépuration (**Figure 81**).

7.2 Perspectives

Il reste encore un grand nombre de résultats à traiter d'avantage dans le détail et à valoriser. Cependant, nos travaux amènent déjà de nouvelles questions :

7.2.1 Maladie du Muscle Marron (BMD)

La nature du génome de l'agent responsable de la BMD a été déterminée. Le fait que ce dernier soit constitué d'ARN et que les clichés de microscopie électronique montrent des particules de 40 nm suggèrent que l'agent étiologique de cette maladie pourrait faire partie de la famille des *picornaviridae*. Cependant, à ce jour, nous ne sommes pas encore parvenus à déterminer l'organisation moléculaire de son génome. De nouvelles tentatives sont actuellement en cours. L'une d'elle s'appuie sur des approches métagénomiques. En effet, des palourdes saines et malades ont été récoltées sur le terrain. Les ARN totaux ont été extraits de leurs muscles. Une approche par RNAseq a été mise en place. A l'heure actuelle, le pyroséquençage par illumina a été réalisé et l'assemblage des séquences obtenues est en cours. Cette approche métagénomique et la comparaison des deux banques réalisées nous permettra, d'une part, d'obtenir une vision complète du transcriptome de *R. philippinarum* et de déterminer les impacts cellulaires de la BMD et les mécanismes moléculaires mis en jeux par la palourde pour lutter contre cet agent étiologique. D'autre part, cette technique devrait nous

permettre d'identifier les transcrits correspondant à l'agent infectieux et par la même réaliser son identification. En effet, des études récentes montrent que les approches métagénomiques se révèlent tout à fait intéressantes dans la caractérisation moléculaire de virus encore inconnus et difficilement cultivables (Belak et al. 2013, Fancello et al. 2012). La connaissance du génome permettra ensuite la mise en place d'une méthode de détection précoce et de quantification de la maladie utilisant les potentialités de la PCR quantitative en temps réel. En effet, à l'heure actuelle l'identification des palourdes malades demande le sacrifice de ces dernières. Cette méthode de détection précoce pourrait être réalisée sur des prélèvements d'hémolymphe. Cette approche permettra de plus de déterminer si cette maladie est exclusivement observée au niveau du bassin d'Arcachon ou s'il est possible de l'observer sur d'autres sites. Dans cette optique, une étude récente décrit des particules virales très semblables à celles de la BMD et impliquées dans la mortalité de palourde en Angleterre (Bateman et al. 2012). De plus, des symptômes identiques à la BMD ont été observés au Portugal au niveau de la baie d'Aveiro (R. Freitas communication personnelle). Un projet ANR franco-portugais a été déposé cette année pour, entre autre chose, aborder ces thèmes.

7.2.2 Aspect microbiote

Nos résultats suggèrent l'existence d'un microbiote de la palourde comme cela a pu être décrit chez d'autres invertébrés marins (e.g. gorgonaires Bally et Garrabou, 2007). Une sélection des communautés bactériennes associées à la palourde à partir des flores environnantes résulte nécessairement d'interactions entre palourdes et bactéries pour former une association, l'holobionte, contribuant à la fitness de la palourde. Dans cette logique, le rôle fonctionnel du microbiote de la palourde reste à démontrer. C'est une des perspectives de ce travail. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées, parmi lesquelles, si l'on écarte les bactéries transitoirement présentes dans le bol alimentaire de la palourde (proies), des interactions de type commensalisme; une association de type neutre liée à la balnéation des bivalves dans un milieu septique (le sédiment); une contribution d'ordre mutualiste liée à une fonction de détoxication et enfin un effet «probiotique» contribuant à la protection du bivalve contre les agents pathogènes (compétition de flores par sécrétion de peptides antimicrobiens). C'est cette dernière hypothèse que nous souhaiterions tester avec deux pistes méthodologiques :
- la recherche de propriétés antagonistes de bactéries cultivables isolées de bivalves marins (palourdes, coques);
- la recherche de fonction particulière par approche métagénomique.
Le projet ANR franco-portugais, cité précédemment abordera aussi ces thèmes.

7.2.3 Aspect multistress

Nous avons développé pour la première fois sur le Bassin d'Arcachon une estimation des accumulations d'une douzaine d'éléments métalliques dans les tissus des palourdes, en tant qu'approche exploratoire de l'état de contamination de ce milieu. Nous avons observé des variations saisonnières dans ces accumulations avec des valeurs dépassant parfois les médianes nationales mesurées dans les huîtres ou dans les moules, notamment pour Ni, Cr, Cu, Pb et également Al et Mn. Au vu du caractère polymétallique de cette contamination du Bassin d'Arcachon dans les palourdes, il serait pertinent dans un premier temps d'étudier en conditions expérimentales contrôlées les effets mélange de ces contaminants à faible dose d'exposition, notamment pour ceux considérés comme prioritaires pour la DCE, ou ceux les plus accumulés dans les tissus, en fonction de différents conditions de salinité ou de température, représentatives des conditions environnementales. D'autre part, un des métaux les plus présents dans les palourdes du Bassin d'Arcachon est le Ni, considéré comme

prioritaire pour la DCE, en plus du Cd, Hg et Pb. Cet élément suscite actuellement des interrogations sur sa toxicité au vu de son caractère récemment reconnu comme potentiellement cancérigène, et compte-tenu du peu de connaissances écotoxicologiques actuellement disponibles, notamment chez les bivalves filtreurs. Comme il semble relativement fortement accumulé dans les palourdes, il serait pertinent d'étudier spécifiquement ses effets toxiques chez cette espèce, de façon à augmenter les connaissances sur la toxicité de ce métal pour les fouisseurs. De même, l'aluminim montre des concentrations relativement élevées dans les palourdes, alors que sa toxicité est très peu étudiée chez les bivalves. Il serait donc pertinent de pouvoir apporter des éléments de réponse quant à son innocuité ou au contraire à son effet éventuellement délétère sur les palourdes. Enfin, l'effet de ces métaux en conditions de stress multiples, les associant aux efflorescences d'algues toxiques et à la perkinsose serait intéressant vu le contexte pathologique dans lequel se trouvent les palourdes du Bassin d'Arcachon. Dans la même optique, l'étude des relations accumulation de Ni et/ou Al - développement de la BMD serait à investiguer. Lors de toutes ces approches, il serait pertinent de continuer à mesurer les paramètres étudiés jusqu'à présent (paramètres immunitaires, réponses des métallothionéines, production de malondialdéhyde, d'ATP, expression de gènes et comportement) et de mettre à profit l'analyse par séquençage haut débit du transcriptome des palourdes pour étudier l'expression de nouveaux gènes non identifiés jusqu'à présent dans ces conditions de multistress afin de pouvoir caractériser les principales fonctions métaboliques ou physiologiques impactées.

8 Références

Abraham J (2012) Etude expérimentale des effets combinant Cd et algues toxiques (*Alexandrium ostenfeldii*) sur la palourde japonaise. Master STEE FDEA, 2ème année, Université Bordeaux1

Achard-Joris M., Gonzalez P., Marie V., Baudrimont M. and Bourdineaud JP., 2006a. Cytochrome *c* oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *Biometals*, 19: 237-244.

Achard-Joris M., Gonzalez P., Marie V., Baudrimont M., Bourdineaud J.P. (2006b) cDNA cloning and gene expression of ribosomal S9 protein gene in the mollusk *Corbicula fluminea*: A new potential biomarker of metal contamination up-regulated by cadmium and repressed by zinc, Environmental Toxicology and Chemistry, 25 (2), 527-533.

Achard-Joris M., Baudrimont M., Boudou A. and Bourdineaud JP. (2004). Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. Aquat Toxicol. 67:347-357.

Aldermann DJ, Gareth-Jones EB (1971) Shell disease of oyster. Fishery Investigations 26:1-19.

Amalfitano S, et Fazi S, (2008) Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. J. Microbiol Methods 75, 237-243.

Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology 76:160-202

Arini A (2011) Décontamination métallique et capacités de récupération de deux composantes biologiques d'un hydrosystème naturel – biofilms diatomiques et bivalves filtreurs- après remédiation d'un site industriel. Thèse de l'université Bordeaux 1, 356p.

Arzul I, Chollet B, Michel J, Robert M, Garcia C, Joly J-P, François C, Miossec L (2012) One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. Parasitology in press

Auzoux-Bordenave S, Vigario AM, Ruano F, Domart-Coulon I, Doumenc D (1995) *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. Journal of Shellfish Research 14:469-475

Bally M., Garrabou J. 2007. Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. Global Change Biology 13 : 2078-2088.

Basti L, Endo M, Segawa S (2011) Physiological, pathological, and defense alterations in Manila clams (short-neck clams), *Ruditapes philippinarum*, induced by *Heterocapsa circularisquama*. Journal of Shellfish Research 30:829-844

Basti L, Segawa S (2010) Mortality of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* induced by the toxic dinoflagellate *Heterocapsus circularisquama*. Fisheries Science in press

Bateman KS, White P, Longshaw M (2012) Virus-like particles associated with mortalities of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in England. Diseases of Aquatic Organisms 99:163-167

Baudrimont M, de Montaudouin X, Palvadeau A (2003) Bivalve vulnerability is enhanced by parasites through the deficit of metallothionein synthesis: A field monitoring on cockles (*Cerastoderma edule*). Journal de Physique IV 107:131-134

Baudrimont M., de Montaudouin X., Palvadeau A. (2006) Impact of digenean parasites infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): a multivariate field monitoring. *Marine Pollution Bulletin,* **52**, 494-502

Baudrimont M, Schäfer J, Marie V, Maury-Brachet R, Bossy C, Boudou A, Blanc G (2005) Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas, Cerastoderma edule*, and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). Science of the Total Environment 337:265-280

Belak S., Karlsson O.E., Blomström A.L., Berg M., Granberg F. (2013) New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. Veterinary Microbiol. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.022.

Bernfeld P., 1955. Amylase, á and â. Method in enzymology I, 149-158.

Binias C, Do VT, Jude-Lemeilleur F, Plus M, Froidefond JM, de Montaudouin X (In press) Environmental factors contributing to the development of Brown Nuscle Disease and perkinsosis in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) and trematodiasis in cockles (*Cerastoderma edule*) of Arcachon Bay. Marine EcologyBodoy A, Prou J, Berthome J-P (1986) Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Haliotis 15:173-182

Bourne Y., Radic Z., Araoz R., Talley T.T., Benoit E., Servent D., Taylor P., Molgo J., & Marchot P. (2010) Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. PNAS, 107 (13), 6076-6081.

Bricelj, V.M. & Cembella, AD. (1995). Fate of gonyautoxins in surf-clams, *Spisula solidissima*, grazing upon toxigenic Alexandrium. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C. eds. Harmful marine algal blooms. Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, 413-418.

Bricelj V.M, Ford S.E., Borrero F.J., Perkins F.O. ; Rivara G., Hilman R.E., Elston R.A., and Chang J. 1992. Unexplained mortalities of hatchery reared, juvenile oysters, Crassostrea virginica (Gmelin). J. Shellfish Res. 11: 331-347.

Burreson EM, Ragone Calvo LM (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of osters in Chesapeake bay, with emphasis on data since 1985. Journal of Shellfish Research 15:17-34

Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Maury-Brachet R, Boudou A, Bourdineaud JP (2010). Serial analysis of gene expression in the skeletal muscles of zebrafish fed with a methylmercury-contaminated diet. Environmental Science and Technology, 44:469-475.

Caro A, Gros O, Got P, De Wit R, Troussellier M, (2007) Characterisation of the population of the sulfur-oxidizing symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by single-cell analyses. Applied and Environmental Microbiology, 73: 2101-2109.

Caro A, Got P, Bouvy M, Troussellier M, Gros O (2009) Effects of long-term starvation on a host bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and its symbiont population. Applied and Environmental Microbiology, 75: 3304-3313.

Choi H-S, Park K-I, Lee K-W, Matsuoka K (2002) Infection intensity, prevalence, and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya bay, Japan. Journal of Shellfish Research 21:119-125

Cigarría J, Rodrígues JM, Fernández JM (1997) Impact of *Perkinsus* sp. on Manila clam *Ruditapes philippinarum* beds. Diseases of Aquatic Organisms 29:117-120

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Magno S, Tartaglione L, Cangini M, Pompei M, Guessini F, Boni L, Pistocchi R, 2006. Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophycae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography-mass spectrometry. Toxicon, 47, 597-604.

da Silva PM, Hégaret H, Lambert C, Wikfors GH, Le Goïc N, Shumway SE, Soudant P (2008) Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions. Toxicon 51:563-573

Dang C (2009) Dynamique des populations de palourdes japonaises (*Ruditapes philippinarum*) dans le Bassin d'Arcachon - Conséquences sur la gestion des populations exploitées. PhD thesis, University Bordeaux 1

Dang C, de Montaudouin X (2009) Brown Muscle Disease and Manila clam *Ruditapes philippinarum* dynamics in Arcachon Bay, France. Journal of Shellfish Research 28:355-362

Dang C, de Montaudouin X, Bald J, Jude F, Raymond N, Lanceleur L, Paul-Pont I, Caill-Milly N (2009a) Testing the Enemy Release Hypothesis: Trematode parasites in the non indigenous Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Hydrobiologia 630:139-148

Dang C, de Montaudouin X, Caill-Milly N, Trumbic (2010a) Spatio-temporal patterns of perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Arcachon Bay (SW France). Diseases of Aquatic Organisms 91:151-159

Dang C, de Montaudouin X, Gam M, Paroissin C, Caill-Milly N (2010b) The Manila clam population in Arcachon Bay (SW France): can it be kept sustainable? Journal of Sea Research 63:108-118

Dang C, de Montaudouin X, Gonzalez P, Mesmer-Dudons N, Caill-Milly N (2008) Brown Muscle Disease (BMD), an emergent pathology affecting Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Arcachon bay (SW France). Diseases of Aquatic Organisms 80:219-228

Dang C., de Montaudouin X., Savoye N., Caill-Milly N., Martinez P., Sauriau P. G. 2009b. Stable isotopes changes in the adductor muscle of diseased bivalve *Ruditapes philippinarum*. Marine biology. 156: 611-618.

Dang C, Gonzalez P, Mesmer-Dudons N, Bonami JR, Caill-Milly N, de Montaudouin X (2009c) Virus-like particles associated with Brown Muscle Disease in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Arcachon Bay (France). Journal of Fish Diseases 32:577-584

Dang C., Sauriau P. G., Savoye N., Caill-Milly N., Martinez P., Millaret C., Haure J., de Montaudouin X. 2009d. Determination of diet in Manila clams by spatial analysis of stable isotopes. Mar. Ecol. Prog. Ser. 387: 167–177.

Douglas, D.J., Kenchington, E.R., Bird, C.J., Pocklington, R., Bradford, B. & Silvert, W. 1997. Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudo-nitzschia multiseries*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54: 907-913.

Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quéré C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain J-F (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditpaes philippinarum*. The Journal of Experimental Biology 206:3053-3064

Dranguet, P. (2012). Effets isolés et combinés de l'exposition de *Corbicula fluminea* à l'hypoxie et au nickel par voie directe en laboratoire. Master 2 FDEA, 25p.

Dubois S (2012). Composition et transfert trophique de la matière organique particulaire dans le bassin d'Arcachon. Thèse de doctorat Université Bordeaux 1, 214 p.

Estrada, N.A., Lagos, N., Garcia, C., Maeda-Martınez, A.N., Ascencio, F. 2007. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of paralytic shellfish poisons in the Pacific giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Mar. Biol. 151,1205–1214

Estrada, N., Rodrıguez-Jaramillo, C., Contreras, G., Ascencio, F. 2010. Effects of induced paralysis on hemocytes and tissues of the giant lions-paw scallop by paralyzing shellfish poison. Mar. Biol. 157,1401–1415

Fancello L., Raoult D., Desnues C. (2012). Computational tools for viral metagenomics and their application in clinical research. *Virology*. 434: 162-174.

Flassch J-P, Leborgne Y (1992) Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. ICES marine Science Symposium 194:92-96

Ford, S.E., Bricelj, V.M., Lambert, C., Paillard, C., 2008. Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes. Marine Biology 154(2), 241-253.

Frank H. and Gerstmann S., 2007. Declining Populations of Freshwater Pearl Mussels (*Margaritifera margaritifera*) are burdened with heavy metals and DDT/DDE, *Ambio,* Volume 38, Issue 2.

Fuhrman, J. A. & J. A. Steele, (2008) Community structure of marine bacterioplankton: patterns, networks, and relationships to function. Aquatic Microbial Ecology 53: 69-81.

Furfari SA (1966) Depuration plant design. Washington DC: Public health service, division of environmental engineering and food protection: 119.

Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H. 2008. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. Harmful Algae 7: 702-711.

Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C. (2002). Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 131(3):281-293.

Gill S., Murphy, M., Clausen J., Richards, D., Quilliam, M.A., MacKinnon, S., LeBlanc, P., Mueller R., Pulido, O., 2003. Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *NeuroToxicology* 24, 593–604.

Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A and Bourdineaud JP. (2006). Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). Biometals, 19 :225-235.

Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., Lassus, P., Soudant, P. 2010a. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. Aquat. Toxicol. 97, 96-108

Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., Sunila, I., Soudant, P. 2010b. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. Harmful Algae 9, 427-439

Harris J M (1993) The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microbial Ecology 25: 195-231.

. 37 (4), 355–373.

Harvell, G. et coll. (1999). Emerging marine diseases – climate links and anthropogenic factors. Science 285: 1505-1510.

Hauser T.A., Hepler C.D., Kombo D.C., Grinevich V.P., Kiser M.K., Dawn N. Hooker D.N., Zhang J., Mountfort D., Selwood A., Akireddy S.R., Letchworth S.R., Yohannes D. (2012) Comparison of acetylcholine receptor interactions of the marine toxins, 13-desmethylspirolide C and gymnodimine. Neuropharmacology. 62(7), 2239–2250.

Hégaret H, da Silva PM, Sunila I, Shumway SE, Dixon MS, Alix J, Wikfors GH, Soudant P (2009) Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 371:112-120

Hégaret H, da Silva PM, Wikfors GH, Lambert C, De Bettignies T, Shumway SE, Soudant P (2007a) Hemocyte response of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. Aquatic Toxicology 84:469-479

Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S. E., Bérard, J.B., Lassus, P. 2007b. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effect on oyster hemocytes. Mar. Biol., 152(2), 441-447.

Ifremer, 2008. Qualité du Milieu Marin Littoral. Bulletin de la surveillance. 55p.

I.F.R.E.MER (2011) Suivi hydrologie et phytoplancton des masses d'eau du bassin hydrographique Adour-Garonne en 2005-2010, IFREMER, Arcachon

Iglesias JIP, Navarro E (1990) Shell growth of the cockle *Cerastoderma edule* in the Mundaca estuary (North Spain). Journal of Molluscan Studies 56:229-238

INRS, 2009. Fiche toxicologique du nickel et ses oxydes.

Krob HA, Fleischer AB Jr, D'Agostino R Jr, Haverstock CL, Feldman S. 2004. Prevalence and relevance of contact dermatitis allergens: a meta-analysis of 15 years of published T.R.U.E. test data. *J Am Acad Dermatol,* 51(3):349-53

Laruelle F, Guillou J, Paulet YM (1994) Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 74:351-366

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

Lassudrie-Duchesne M. (2011). Impacts de l'exposition à *Alexandrium ostenfeldii* sur le système antioxydant de la palourde *Ruditapes philippinarum* présentant des degrés variables de perkinsose. Master Sciences Biologiques Marines, 2ème année, Université de Brest.

Lassus, P., Amzil, Z. et coll. (2007). Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii.* Aquatic Living Resource, 20: 59-67.

Lassus P, Bardouil M, Beliaeff B, Bougrier S, Gubbins M, Masselin P, Mornet F, Thébaud O, Truquet P et al, 2002. Coquillages contaminés par des phycotoxines paralysantes : vers une procédure de détoxification. Bilans et prospective, IFREMER Publish., 47 pp..

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

Legeay A., Achard-Joris M., Baudrimont M., Massabuau JC and Bourdineaud JP. (2005). Impact of cadmium contamination and oxygen levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea.* Aquatic Toxicology, 74, 242-253.Leite RB, Afonso R, Cancela ML (2004) *Perkinsus* sp. infestation in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (L), along the Portuguese coast. Results from a 2-year survey. Aquaculture 240:39-53

Leite R.B., Afonso R., Cancela M.L. (2004) *Perkinsus* sp. infestation in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (L), along the Portuguese coast. Results from a 2-year survey. *Aquaculture,* **240**, 39-53.

Lopez-Gutierrez J.C, Henry S, Hallet S, Martin-Laurent F, Catroux G, Philippot L (2004) Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. Journal of Microbiological Methods 57: 399–407.

Louis Dit Trieau C (2010) Etude en laboratoire de la bioaccumulation et des réponses biochimiques chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* exposée au cadmium. Master STEE Ecologie, 1ère année, Université Bordeaux1

Mafra LL, Bricelj, VL, Ouellette C, Léger C, Bates S. 2009. Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells I Filtration and pseudofeces production. Aquatic Biology. 6 (1-3) : 201-212.

Marie V., Baudrimont M. and Boudou A., 2006a. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere*, 65: 609-617.

Marie V., Gonzalez P., Baudrimont M., Bourdineaud JP. and Boudou A., 2006b. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals*, 19: 399-407.

Medhioub W., 2011. Etude des mécanismes de contamination des mollusques bivalves par des neurotoxines à action rapide (FAT) et développement de procédés de detoxification. Thèse en co-tutelle Université de Tunis El-Manar/UBO soumise le 9 mai 2011. 202 pages.

Medhioub, W., Lassus, P., Truquet, P., Bardouil, M., Amzil, Z., Séchet, V., Sibat, M., Soudant, P. 2012. Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. Aquaculture. *358-359, 108-115.*

Meisterhans G, Raymond N, Lebreton S, Salin F, Bourasseau L, de Montaudouin X, Garabétian F, Jude-Lemeilleur F (2011) Dynamics of bacterial communities in cockles (*Cerastoderma edule*) with respect to trematode parasite (*Bucephalus minimus*) infestation. Microbial Ecology 62:620-631

Menzel RW, Hopkins SH (1995). The growth of oysters parasitized by the fungus *Dermocystidium marinum* and by the trematode *Bucephalus cuculus.* Journal of Parasitology 41: 333-342.

de Montaudouin X, Paul-Pont I, Lambert C, Gonzalez P, Raymond N, Jude F, Legeay A, Baudrimont M, Dang C, Le Grand F, Le Goïc N, Bourasseau L, Paillard C (2010) Bivalve population health: multistress to identify hot spots. Marine Pollution Bulletin 60:1307-1318

Meziti A, Ramette A, Mente E, Kormas KA. 2010. Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities. FEMS Microbial Ecology 74: 472-484

Morisson CM, Dial SM, Day WA Jr, Joens LA. 2012. Investigations of Salmonella enterica serovar newport infections of oysters by using immunohistochemistry and knockout mutagenesis. AEM 78(8):2867-73.

Mouchet F., Baudrimont M., Gonzalez P., Cuenot Y., Bourdineaud J.P., Boudou A., Gauthier L. (2006). Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. Aquatic Toxicology, 78:157-166.

Mouneyrac C, Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C (2000) Metallothionein-like proteins in *Macoma balthica*: effects of metal exposure and natural factors. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57:34-42

Oshima, Y. & Narita, Y. (2001). Excretion is the major PSP depuration mechanism by short –necked clams *Tapes philippinarum*. In Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, 2386. 68.

Paillard, C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, Ruditapes philippinarum and Ruditapes decussatus. Aquat Living Resour 17, 467-475.

Paillard C, Maes P (1994) The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II. Microscopic study of the brown ring syndrome. Journal of Invertebrate Pathology 65:101-110

Paillard C, Maes P (1995) The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I. Ultrastructural alteration of the periostracal lamina. Journal of Invertebrate Pathology 65:91-100

Paillard C, Maes P, Mazurié J, Claude S, Marhic A, Le Pennec M (1997) Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variations of prevalence 8th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics. Association pour l'Etude de l'Epidémiologie et des Maladies animales, p 8-11

Paillard C, Maes P, Oubella R (1994) Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases 4:219-240

Park K-I, Choi K-S (2001) Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum,* in Korea. Aquaculture 203:9-22

Paul-Pont I (2010) Sensibilité et adaptation de populations de bivalves marins soumis à des stress multiples: infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique. PhD, Bordeaux 1

Paul-Pont I, de Montaudouin X, Gonzalez P, Jude F, Raymond N, Paillard C, Baudrimont M (2010a) Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. Environmental Pollution 158:3401-3410

Paul-Pont I, de Montaudouin X, Gonzalez P, Soudant P, Baudrimont M (2010b) How life-history contributes to stress response in Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Environmental Science of Pollution Research 17:987-998

Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M, Jude F, Raymond N, Bourrasseau L, Le Goïc N, Haynes F, Legeay A, Paillard C, de Montaudouin X. (2010). Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. Mar Pollut Bull 60(4):515-525.

Paul-Pont I, Meisterhans G, Raymond N, Bourrasseau L, de Montaudouin X, Garabetian F, Jude-Lemeilleur F (en préparation) Evidence for specific bivalve-associated bacteria in cockles (*Cerastoderma edule*) and clams (*Ruditapes philippinarum*).

Pierron F., Baudrimont M., Dufour S., Elie P., Bossy A., Baloche S., Mesmer-Dudons N., Gonzalez P., Bourdineaud J-P. and Massabuau J-C., 2008. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environmental Science and Technology*, 42: 4607–4612.

Pierron F., Baudrimont M., Dufour S., Elie P., Bossy A., Lucia M. and Massabuau JC., 2009. Ovarian gene expression and effects of cadmium pre-exposure during artificial sexual maturation of the European eel (*Anguilla anguilla*). *BioMetals*, 22: 985-994.

Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbiere F, Thioulouse J, Nazaret S (2000) Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (ARISA). Microb Ecol 39: 263-272.

Rocher C (2011) Etude expérimentale de la bioaccumulation et du comportement valvaire chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* exposée au cadmium. Master STEE Ecologie, 1ère année, Université Bordeaux1.

Sanchez F, Caill-Milly N, Lissardy M, de Casamajor M-N, Binias C, Bru N (en révision) Campagne d'évaluation du stock de palourdes du bassin d'Arcachon - année 2012, Ifremer

SOGREAH (2001) Bassin d'Arcachon - Amélioration de l'hydraulique réflexion sur la programmation des travaux. Report No. n°71 1027 R, SOGREAH - Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon

Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A, Donaghy L, Birkbeck TH (2004) Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (=*Tapes*, =*Ruditapes*) *philippinarum*. Aquaculture 401-418

Tanaka R, Sugimura I, Sawabe T, Yshimizu M, Ezura Y (2003). Gut microflora of abalone *Haliotis discus hannai* in culture changes coincident with a change in diet. Fisheries Sciences, 69: 951

Tanaka R, Ootsubo M, Sawabe T, Ezura Y, Tajima K (2004) Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. Aquaculture, 241: 453-463.

Tillmann U, John U, Cembella A (2007) On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. J Plankton Res 29:527–543

Tran D, Boudou A, Massabuau J-C (2002) Relationship between feeding induced ventilatory activity and accumulation rate of dissolved and algae-bound cadmium in quiescent Asiatic clam *Corbicula fluminea*. Environmental Toxicology and Chemistry 21:327-333

Villalba A, Casas SM, López C, Carballal MJ (2005) Study of perkinsiosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. Diseases of Aquatic Organisms 65:257-267

Villalba A, Reece KS, Ordás MC, Casas SM, Figueras A (2004) Perkinsosis in molluscs: A review. Aquatic Living Resource 17:411-432

Waki T, Shimokawa J, Watanabe S, Yoshinaga T, Ogawa K (2012) Experimental challenges of wild Manila clams with *Perkinsus* species isolated from naturally infected wild Manila clams. Journal of Invertebrate Pathology 111:50-55

Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. Free Radic. Biol. Med, 36, 1434-1443.

Walne PR, Mann R (1975) Growth and biochemical composition *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In: H Barnes (ed) Proc.9th Europeen Marine Biology Symposium. Oban. Aberdeen University Press, Aberdeen, pp. 587-607.

Yang H-S, Park K-I, Donaghy L, Adhya M, Choi K-S (2012) Temporal variation of *Perkinsus olseni* infection intensity in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Gomso Bay, off the west coast of Korea. Journal of Shellfish Research 31:685-690

Zaroogian G., Yevich P. (1994) The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica.* Marine Environmental ResearchMao H, Wang D-H, Yang W-X (2012) The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrates. Aquatic Toxicology 110-111:208-213

Zaroogian G., Yevich P., Pavignano S. (1989) The role of the red gland in *Mercenaria mercenaria* in detoxification. Marine Environmental Research. 28(1–4), 447–450.

9 Valorisation scientifique et pédagogique

PUBLICATIONS PARUES OU SOUS PRESSE

Binias C, Do VT, Jude-Lemeilleur F, Plus M, Froidefond JM, de Montaudouin X (sous presse) Environmental factors contributing to the development of Brown Muscle Disease and perkinsosis in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) and trematodiasis in cockles (*Cerastoderma edule*) of Arcachon Bay. Marine Ecology

Dang C., de Montaudouin X., Salvo F., Caill-Milly N., Bald Juan, Soudant P. (en révision) Correlation between *Perkinsus* sp. abundance, growth and condition in clams *Ruditapes* spp. Diseases of Aquatic Organisms.

Lelong A., Bucciarelli E., Hégaret H., Soudant P. (2013) Iron and copper limitations differently affect growth rates, photosynthetic and physiological parameters of the marine diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima*. *Limnology and Oceanography*, 58(2), in press.

Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P. (2011) Cell-based measurements to assess physiological status of *Pseudo-nitzschia multiseries*, a toxic diatom. *Research in Microbiology* 162: 969-981.

Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., Bates, S.S. (2012). *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51: 168–216.

Lelong A., Jolley D., Hégaret H., Soudant P. (2012). The effects of copper toxicity on *Pseudo-nitzschia* spp. physiology and domoic acid production. *Aquatic Toxicology*. 118– 119 :37–47

Medhioub, W., Séchet, V., Truquet, P., Bardouil, M., Amzil, Z., Lassus, P., Soudant, P. (2011) *Alexandrium ostenfeldii* growth and spirolides production in batch culture and photobioreactor. Harmful Algae 10(6) : 794-803.

Medhioub, W., Lassus, P., Truquet, P., Bardouil, M., Amzil, Z., Séchet, V., Sibat, M., Soudant, P. (2012) Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. Aquaculture 358: 108-115.

Meisterhans G, Raymond N, Lebreton S, Salin F, Bourasseau L, de Montaudouin X, Garabétian F, Jude-Lemeilleur F (2011) Dynamics of bacterial communities in cockles (*Cerastoderma edule*) with respect to trematode parasite (*Bucephalus minimus*) infestation. Microbial Ecology 62:620-631

PUBLICATIONS EN PREPARATION

Lassudrie et al. (en préparation) Combined effects of *Perkinsus olseni* and *Alexandrium ostenfeldii* on physiological responses of Manila clam *Ruditapes philippinarum*

Meisterhans G, Raymond N, Girault E, Lambert C, Bourrasseau L, de Montaudouin X, Garabetian F, Jude-Lemeilleur F (en préparation) Structure of clam microbiota at the organ scale in contrasting sets of *Ruditapes philippinarum* individuals.

Paul-Pont I, Meisterhans G, Raymond N, Bourrasseau L, de Montaudouin X, Garabetian F, Jude-Lemeilleur F (en préparation) Evidence for specific bivalve-associated bacteria in cockles (*Cerastoderma edule*) and clams (*Ruditapes philippinarum*).

COMMUNICATIONS ORALES

Binias C, Provost M, Do VT, Plus M, Gonzalez P, de Montaudouin X (2012) Perkinsosis and Brown Muscle Disease in Manila clam *Ruditapes philippinarum*: control by abiotic factors and/or synergic interaction? Physiomar 2012, Santiago de Compostela (Spain)

Caill-Milly N, Borie C, Mahé K, Bru N, Binias C, de Montaudouin X, D'Amico F (2011) Spatial variation in allometry patterns of the Manilla clam (*Ruditapes philippinarum*) in the Arcachon Bay (France) 5th European Conference on Coastal Lagoon Research, Aveiro (Portugal)

de Montaudouin X (2012) Approche de la notion de Multistress chez les bivalves marins : les interactions hôtes-parasites chez la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*) Groupement des Protistologues de Langue Française - Les protistes : adaptation à leur environnement, La Rochelle

Hégaret, H., Henry, N., Bunel, M., Lassudrie, M., Le Goic, N., Lambert, C., Donval, A.,Fabioux, C., de Montaudouin, X., Soudant, P. (2012). Impacts of *Alexandrium ostenfeldii* on behavioral and physiological responses of Manila clams *Ruditapes philippinarum* naturally infected with the parasite *Perkinsus olseni.* National Shellfisheries Association meeting NSA2012, Seattle, USA

Lassudrie, M., Hégaret, H., Henry, N., Lambert, C., Le Goic, N., Soudant, P., Fabioux, C. (2012). Impacts of *Alexandrium ostenfeldii* exposure upon antioxidant system of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden. National Shellfisheries Association meeting NSA2012, Seattle, USA

Lassudrie, M., Hégaret, H., Henry, N., Lambert, C., Le Goic, N., Soudant, P., Fabioux, C. (2012). Impacts of *Alexandrium ostenfeldii* exposure upon antioxidant system of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden. Milford Aquaculture Seminar MAS2012, CT, USA

Lelong A., Hégaret H., Soudant P. 2010. Development of cell-based physiological measurements on the toxic diatoms, *Pseudo-nitzschia* spp. Harmful Algal Bloom Conference HAB2010, Hersonissos, Crète.

Lelong A., Jolley D., Kraffe E., Hégaret H., Soudant P. The effects of copper toxicity on *Pseudo-nitzschia* spp. physiology and domoic acid production. Phycological Society of America PSA2011, Seattle, USA

Meisterhans G, Raymond N, Lambert E, Girault E, Paul-Pont I, Bourasseau L, de Montaudouin X, Garabétian F, Jude-Lemeilleur F (2011a) L'état physiologique et/ou l'habitat de la palourde (*Ruditapes philippinarum*) conditionnent-ils la composition de son microbiote? AFEM symposium, Hammamet (Tunisia)

POSTERS

Binias C, Biacchesi S, Bremont M, Caill-Milly N, Dang C, Gonzalez P, Heude C, Kellner K, Lucia M, Martinez P, Mathieu M, Merour E, Mesmer-Dudons N, Sauriau P-G, Savoye N, de Montaudouin X (2012a) Brown Muscle Disease in Manila clam *Ruditapes philippinarum* Physiomar 2012, Santiago de Compostela (Spain)

Do VT, Binias C, Jude F, Plus M, de Montaudouin X (2010) Environmental factors contributing to the development of Brown Muscle Disease and perkinsosis in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) and trematodiasis in cockles (*Cerastoderma edule*) of Arcachon Bay 45th European Marine Biology Symposium, Edinburgh (United Kingdom)

Girault E, Meisterhans G, Paul-Pont I, Jude-Lemeilleur F, Bourasseau L, Lambert C, de Montaudouin X, Garabétian F, Raymond N (2011) Is Manila clam bacterial community structure influenced by the bivalve sub-population intrinsec characteristic and/or habitat microbial communities? 5th European Conference on Coastal Lagoon Research, Aveiro (Portugal)

VALORISATION ET CONCERTATION MUTUALISEES (EPOC - CDPMEM 33 – CRPMEM Aquitaine)

- Présentation du projet aux professionnels et au CDPMEM 33 (anciennement CLPMEM Arcachon) : le 13 décembre 2010 ;
- Association du laboratoire EPOC à toutes les réflexions du CDPMEM 33 et du CRPMEM Aquitaine sur la palourde japonaise, et en particulier :
    - Commission palourdes du CDPMEM 33 le 16/02/2012 : Présentation des derniers travaux scientifiques sur la palourde, par le laboratoire EPOC (en particulier BMD). Echanges avec les professionnels sur cette thématique.
    - Groupe de travail Palourdes du CDPMEM 33 : 09/10/2012, Participation du laboratoire EPOC aux discussions de ce groupe de travail, en particulier sur l'organisation et le suivi de la campagne d'évaluation du stock de palourdes réalisée en 2012
- A venir : restitution des travaux de REPAMEP aux pêcheurs professionnels de palourdes.
- Le poster de présentation du projet Liteau 3 REPAMEP a également été valorisé par le CRPMEM Aquitaine lors du Colloque national de l'Agence des Aires Marines Protégées (15 au 17 novembre 2010).

RAPPORTS

Bardouil M et al (2012) Effet d'une exposition à *Alexandrium ostenfeldii* sur la réponse alimentaire et la bioaccumulation de spirolides chez *Ruditapes philippinarum*. Rapport Ifremer 09/12/181 66/NF : 67 pp.

de Montaudouin X et al. (2011) Réponse des palourdes aux stress environnementaux combinant métaux, efflorescences toxiques et pathogènes. Rapport mi-parcours Liteau-Repamep. 46 pp.

THESES

Binias C (prévue fin 2013) Caractérisation de l'agent infectieux et épidémiologie de la Maladie du Muscle Marron, une pathologie émergeante de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum.*

Do T (2012) Evaluation et santé des herbiers à *Zostera noltii* dans le Bassin d'Arcachon à travers la dynamique de la macrofaune associée. Thèse Université Bordeaux 1

Lassudrie M. (2011-2014) Impact couplé de microalgues toxiques et des pathogènes sur les réponses physiologiques de mollusques bivalves. Ecole Doctorale Mer et sante, Brest.

Lelong A. (2009-2011) Ecophysiologie de la diatomée toxique *Pseudo-nitzschia* sp. et interactions avec les eucaryotes et procaryotes sympatriques. Ecole Doctorale Mer et sante, Brest.

Medhioub W. (soutenance le 9/05/2011) : Etude des mécanismes de contamination des mollusques bivalves par des neurotoxines à action rapide (FAT) & développement de procédés de détoxification

Meisterhans G (2012) Dynamique de la structure génétique des communautés procaryotes en zone benthique côtière: caractérisation de la microflore des sédiments et des bivalves fouisseurs par empreintes moléculaires. Thèse Université Bordeaux 1.

DEVENIR DES DOCTEURS

Meisterhans G est en post doctorat depuis mars 2012 pour 2 ans au Department Fisheries and Oceans Canada, Freshwater Institute, Winnipeg, sous la direction de Christine MICHEL.

Do, V.T. est en poste à l'Université d'Hanoï, Vietnam

RAPPORTS UNIVERSITAIRES

Abraham J (2012) Etude expérimentale des effets combinant Cd et algues toxiques (*Alexandrium ostenfeldii*) sur la palourde japonaise. Master STEE FDEA, 2ème année, Université Bordeaux1

Binias C (2010) Etude zooépidémiologique d'une maladie de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* dans le Bassin d'Arcachon: la perkinsose. Master Sciences et Technologie, 2ème année Université Bordeaux 1

Binias C (2010) Etude zooépidémiologique d'une maladie de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* dans le Bassin d'Arcachon: la perkinsose. Master Sciences et Technologie, 2ème année Université Bordeaux 1

Bunel M. (2011). Etude de l'impact d'une efflorescence d'*Alexandrium ostenfeldii* sur l'activité des enzymes digestives de la palourde japonaise *Ruditapes phlippinarum.* Master 1 SBM, Brest, 2011.

Dranguet P (2011) Bioaccumulation des métaux et réponse des métallothionéines chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* provenant du Bassin d'Arcachon. Master STEE Ecologie, 1ère année, Université Bordeaux1

Girault H (2011) Caractérisation des communautés bactériennes associées à la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum.* Master 2 Professionnel Diagnostic Microbiologique – Approches Innovantes, Université Toulouse 3.

Henry N. (2011) Etude de l'impact d'une efflorescence d'*Alexandrium ostenfeldii* sur les tissues de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum.* Master 1 SBM, Brest, 2011.

Lassudrie M. (2011) Réponse Moléculaire de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* lors d'une exposition à la micro-algue Toxique *Alexandrium ostenfeldii.* Master 2 SBM, Brest.

Le Croizier G. (2010). Etude de l'enfouissement de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* en fonction de certains facteurs de stress environnementaux. Master 1 SBM, Brest, 2010.

Louis Dit Trieau C (2010) Etude en laboratoire de la bioaccumulation et des réponses biochimiques chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* exposée au cadmium. Master STEE Ecologie, 1ère année, Université Bordeaux1

Nzimandoukou E (2011) Etude expérimentale des concentrations en métallothionéines chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* exposée au cadmium. Master STEE Ecologie, 1ère année, Université Bordeaux1.

Provost M (2012) Suivi de la perkinsose et de son interaction avec la maladie du muscle marron chez la palourde japonaise dans le Bassin d'Arcachon. Master Sciences et Technique Terre Planète et Environnement, 2ème année Université de Nantes:24

Richard G. (2012) Impact de l'exposition à *Alexandrium ostenfeldii* couplé à l'infection parasitaire par *Perkinsus olseni* sur les enzymes du système anti-oxydant de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum.* Master 2 Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse, Brest.

Rocher C (2011) Etude expérimentale de la bioaccumulation et du comportement valvaire chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* exposée au cadmium. Master STEE Ecologie, 1ère année, Université Bordeaux1.