

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE – BREST

Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Discipline : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Marie-Agnès TRAVERS

le 15 septembre 2008

**Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata* :
approches physiologiques, cellulaires et moléculaires**

JURY :

Tristan RENAULT , Cadre de recherche, Ifremer la Tremblade	Rapporteur
Serge MORAND , Directeur de recherche, CNRS Montpellier	Rapporteur
Jacques CLAVIER , Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
Françoise GAILL , Directeur de recherche, CNRS Paris	Examineur
Carolyn FRIEDMAN , Professor associate, University of Washington	Examineur
Marcel KOKEN , Chargé de recherche, CNRS Brest	Examineur
Christine PAILLARD , Chargé de recherche, CNRS Brest	Directeur de thèse
Jean-Louis NICOLAS , Cadre de recherche, Ifremer Brest	Membre invité
Sylvain HUCHETTE , SCEA France Haliotis, Plouguerneau	Membre invité

Cette thèse a été financée par la SCEA France Haliotis (Plouguerneau, France) et la région Bretagne dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la REcherche ou CIFRE.

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES.....	6
INDEX DES TABLES.....	8
RESUME.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
INTRODUCTION.....	16
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	22
1. L'ORMEAU.....	24
1.1. Phylogénie et répartition géographique.....	24
1.1.1 Les <i>Haliotidae</i>	24
1.1.2 <i>Haliotis tuberculata</i> (Linnaeus, 1758).....	25
1.2. Biologie de l'ormeau.....	27
1.2.1 Habitat.....	27
1.2.2 Anatomie.....	28
1.2.3 Reproduction et développement.....	33
1.2.4 Alimentation.....	36
1.3. L'immunité.....	37
1.3.1 Les hémocytes.....	37
1.3.2 L'immunité cellulaire.....	38
1.3.3 L'immunité humorale.....	43
1.3.4 Modulation de l'immunité.....	46
1.3.5 Mémoire immunitaire ?.....	50
1.3.6 Conclusion générale sur l'immunité.....	53
1.4. Les maladies des ormeaux.....	53
1.4.1 Maladies associées à des agents métazoaires.....	53
1.4.2 Maladies associées à des agents protozoaires.....	55
1.4.3 Maladies bactériennes.....	60
1.4.4 Maladies virales.....	62

2. LES VIBRIOS.....	64
2.1. Caractéristiques phénotypiques et génétiques	64
2.1.1 Caractéristiques phénotypiques	64
2.1.2 Classification et phylogénie.....	64
2.1.3 Caractéristiques génétiques.....	66
2.2. Habitat et cycle de vie	68
2.3. Les vibrions pathogènes	69
2.3.1 Chez l'Homme.....	70
2.3.2 Chez les vertébrés marins.....	73
2.3.3 Chez les coraux.....	74
2.3.4 Chez les invertébrés marins	75
2.4. <i>V. harveyi</i>	79
2.5. Détection et localisation des vibrions.....	81
2.6. Vibriophages et plasmides.....	83
2.7. Facteurs de virulence : Pouvoir de colonisation et de multiplication.....	91
2.8. Facteurs de virulence : Pouvoir toxigène.....	99
2.9. Facteurs de virulence : <i>V. harveyi</i>	103
2.10. Facteurs de virulence : Communication et régulation	104
3. INTERACTION <i>V. HARVEYI</i> - ORMEAU.....	110
3.1. La vibriose de l'ormeau japonais	110
3.2. La vibriose de l'ormeau européen.....	111
4. CONCLUSION.....	112

RESULTATS..... 114

CHAPITRE 1 : Diagnostique et facteurs de développement de la vibriose 115

Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. Article 1: Soumis à Global Change Biology

Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. Article 2 : Soumis à FEMS Microbiology Ecology.....

CHAPITRE 2 : Immunité de l'ormeau et sensibilité à *V. harveyi*..... 141

Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. Article 3: Fish and Shellfish Immunology..... 143

Seasonal immune-depression associated with increased susceptibility of the european abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. Article 4: Soumis à Fish and Shellfish Immunology 155

CHAPITRE 3 : Souches de *V. harveyi* et virulence..... 169

Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic isolates, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. Article 5: Soumis à Journal of Cellular Biochemistry 173

pVCR1, a plasmid responsible for the virulence of *Vibrio harveyi* strain ORM4 towards the European abalone, *Haliotis tuberculata*. Article 6: En préparation 185

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 199

1. UN NOUVEAU MODELE D'INTERACTION GASTEROPODE MARIN - VIBRIO, MODULE PAR L'ENVIRONNEMENT 201
 - 1.1 Importance de la température et de l'état de reproduction des animaux 202
 - 1.2 La vibriose de l'ormeau européen, un modèle de référence pour l'étude du système « environnement – hôte – pathogène » ? 207
 - 1.3 Réchauffement climatique : une maladie émergente ? 208
2. CYCLE INFECTIEUX, LOCALISATION BACTERIENNE 209
3. IMMUNITE DE L'ORMEAU ET INTERACTIONS *INVITRO*..... 212
4. VIRULENCE DE *V. HARVEYI* ET PLASMIDE..... 214
5. CONCLUSION GENERALE 215

ANNEXE217

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....217

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Schéma des interactions hôte – pathogène – environnement.	18
Figure 2: Arbre phylogénétique des <i>Haliotidae</i> (selon Geiger, 1999).....	25
Figure 3 : Répartition d' <i>H. tuberculata</i> (adapté de Geiger, 2000 et Le Bras <i>et al.</i> , soumis) ...	26
Figure 4: <i>H. tuberculata</i> – coquilles (selon Geiger, 1999).....	27
Figure 5 : <i>H. tuberculata</i> dans son milieu naturel.....	27
Figure 6: <i>H. tuberculata</i> - vues ventrale et dorsale	28
Figure 7 : Retournement d' <i>H. tuberculata</i>	30
Figure 8 : <i>H. tuberculata</i> - vue décoquillée d'une femelle	30
Figure 9 : Aspect histologique de la gonade femelle à divers stades du cycle sexuel	34
Figure 10 : Développement larvaire (adapté de Belhsen, 2000)	35
Figure 11 : Schéma récapitulatif du processus de phagocytose chez des cellules hémocytaires de mollusque en contact avec des microorganismes (vert)	39
Figure 12 : Processus de dégradation intracellulaire.....	42
Figure 13 : Explication mécanistique de la réponse immunitaire spécifique (selon Rowley <i>et al.</i> , 2007)	51
Figure 14 : Polychètes perforants.....	54
Figure 15 : <i>Labyrinthuloide haliotidis</i> (selon Bower, 2005).....	55
Figure 16 : <i>Haplosporidium montforti</i> (selon Azevedo <i>et al.</i> , 2006 2008).....	57
Figure 17 : <i>Perkinsus olseni</i>	59
Figure 18 : Withering Syndrome.....	61
Figure 19 : L'herpès virus en Australie, localisation et symptômes	63
Figure 20 : Phylogénie des vibrions (selon Thompson <i>et al.</i> , 2004).....	65
Figure 21: Cycle infectieux de <i>V. cholerae</i> (selon Reidl <i>et al.</i> , 2002).....	71
Figure 22 : Maladie lumineuse des crevettes causée par <i>V. harveyi</i> (selon Defoirdt, 2005) ...	81
Figure 23 : Phage VHML (selon Oakey <i>et al.</i> 2000)	89
Figure 24 : Phage VHS1 (selon Pasharawipas <i>et al.</i> , 2005).....	90
Figure 25 : Flagelle de bactérie à Gram-négative (adapté de Pallen et Matz, 2007)	92
Figure 26 : <i>V. harveyi</i> souche ORM4 en microscopie électronique à transmission.....	93
Figure 27 : Biofilms observés formés par <i>V. parahaemolyticus</i> (selon Shime-Hattori <i>et al.</i> 2006).....	95
Figure 28 : Plasmide pJM1 et l'anguibactine (Selon Lopez & Crosa 2007).....	96

Figure 29: Systèmes 1 (A) et 2 (B) du quorum sensing (adapté de Turovskiy <i>et al.</i> , 2008)..	106
Figure 30 : Quorum sensing chez <i>V. harveyi</i> (adapté de Turovskiy <i>et al.</i> , 2008).....	107
Figure 31 : Carte de Bretagne présentant les zones géographiques où des mortalités estivales d'ormeaux ont été signalées (adapté de Huchette et Clavier, 2004).	112
Figure 32 : Signes macroscopiques de la maladie.....	116
Figure 33 : Coupes histologiques (5 µm) de muscles de moribonds	117
Figure 34: Estimation du taux de croissance moyen pendant la phase exponentielle de croissance de différentes souches de <i>V. harveyi</i>	170
Figure 35 : Représentations des 3 conditions nécessaires au développement de la maladie :	202
Figure 36 : Représentation des interactions hôte – pathogène – environnement, et des potentielles étapes de l'infection.	204
Figure 37: Représentation schématique hypothétique des étapes infectieuses qui mènent à la mort des ormeaux.	211
Figure 38 : Représentation des interactions hôte – pathogène – environnement, et hypothèses sur l'échec infectieux de <i>V. harveyi</i> quand celui-ci est sans plasmide (<i>V. harveyi</i> sans pVCR1).	214

INDEX DES TABLES

Tableau 1 : Composition du génome des membres séquencés de la famille des vibrions.....	67
Tableau 2 : vibrions associés à des mortalités d'ormeaux	77
Tableau 3 : Maladies d'animaux d'élevage associées à <i>V. harveyi</i> (adapté de Defoirdt <i>et al.</i> 2007b).....	80
Tableau 4 : Plasmides de vibrions séquencés à l'heure actuelle.	86

RESUME :

Depuis quelques années seulement, l'aquaculture d'ormeau se développe en Europe, mais doit déjà faire face à de nombreuses maladies. Les populations naturelles, comme les élevages, d'*Haliotis tuberculata*, ont subi de fortes pertes depuis les années 1997, principalement à cause d'une bactérie pathogène, *Vibrio harveyi*. La vibriose de l'ormeau européen, ses signes macroscopiques, ainsi que les conditions favorables à son développement ont été étudiés par des suivis *in situ* et des expériences en laboratoire. Ces études nous ont permis de démontrer l'importance de la température (>17°C), de la physiologie des animaux (période de reproduction) et de la présence d'une souche pathogène (porteuse du plasmide pVCR1) pour le développement de la vibriose. Un cycle de la maladie et une première localisation des tissus cibles des ormeaux (branchies, muscle et hémolymphe) ont été proposés. De plus, un lien clair entre période de reproduction avec un déficit immunitaire et la sensibilité des animaux a également été établi. Par des approches moléculaires, il a été démontré que les souches virulentes de *V. harveyi* interfèrent avec le système immunitaire probablement via une inhibition partielle de la voie d'activation des MAP Kinases dans les hémocytes. Enfin, nous avons pu mettre en évidence le rôle clé du plasmide pVCR1 dans la virulence des souches.

Mots clés : Ormeau, *Haliotis tuberculata*, bactéries, *Vibrio harveyi*, vibriose, température, immunité, reproduction, hémocytes, MAP Kinases, plasmide, virulence, GFP.

ABSTRACT

Abalone aquaculture only recently developed in western Europe, but already it has to face numerous pathologies. Since 1998, the natural and farm stocks of *Haliotis tuberculata* suffer regularly high mortalities, mainly due to the pathogenic bacterium, *Vibrio harveyi*. The vibriosis of the European abalone, in particular its macroscopic signs, and the conditions necessary for its development have been studied in detail by field and laboratory experiments. We have been able to show the importance of the interplay between water temperature (>17°C), animal physiology (reproduction period) and a pathogenic strain (harbouring the plasmid pVCR1) for the development of this abalone disease. A limited localisation study of the abalone target tissues (gills, muscle and haemolymph) has been performed and a 3 phase disease development model is hypothesized. A clear link between the reproduction period with its accompanying immune deficiency and the animals sensitivity to the pathogen has been established. By a molecular approach, it has been discerned that the virulent *V. harveyi* strains directly intervene with the animal's immune system, probably through a partial inhibition of the MAP kinase pathway activation in the haemocyte. Finally, we were also able to show the utmost importance of the pVCR1 plasmid for the virulence phenotype of this pathogenic bacterium.

Keywords : Abalone, *Haliotis tuberculata*, bacteria, *Vibrio harveyi*, vibriosis, temperature, immunity, reproduction, haemocytes, MAP Kinases, plasmid, virulence, GFP.

LISTE DES ABREVIATIONS

Fe ³⁺	Fer ferrique
H ₂ O ₂	Péroxyde d'Hydrogène
OH ⁻	Anion hydroxyle
¹ O ₂	Radical singulet de l'oxygène
ONOO ⁻	Peroxynitrite
ABC	ATP-binding cassette
AbTPx	Abalone Thioredoxine Peroxydase
ACP	Acid Phosphatase
acyl-HSL	acyl-Homo Sérine Lactone
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADPRT	ADP-ribosylating toxin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AhpC	Alkyl HydroPeroxidase reductase
AI	AutoInducteurs
ALP	Alkaline Phosphatase
AMP c	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AOD	American Oyster Defensin
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
BPI	Bacterial Permeability Increasing protein
COI	Cytochrome Oxydase I
CPS	Capsular PolySaccharide
CT	Choleric Toxin
Dam	DNA adenine methyl transferase
Def	Defensin
DL50	Doses Létales 50
Dscam	Down's syndrome cell adhesion molecule
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase-1

EST	Expressed Sequence Tag
FTM	Fluid Thioglycollate Medium
FREP	Fibrinogen Related Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
His	Histidine
Ig	Immunoglobuline
JNK	Jun N-terminal Kinase
LBP	LPS- Binding Protein
LPS	LipoPolySaccharide
Ma	Millions d'années
MAP Kinase	Mitogen activated Kinase
MLST	Multilocus Sequence Typing
MPO	MyéloPéroxydase
Mpeg1	Macrophage expressed gene 1
MSHA	Mannose-Sensitive Hemagglutinin Pilus
MSX	Multinucleated sphere unknown
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Oxyde Nitrique
NOS	NO Synthase
ORF	Open Reading Frame
OTC	Oxytetracycline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Protéine kinase A
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PRP	Pathogen Recognition Pattern
QS	Quorum Sensing
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RTX	Repeats in Toxin
SOD	Superoxyde dismutase
SST I à VI	Système de Sécrétion de Type 1 à 6
TCBS	Thiosulfate-Citrate-Bile salt-Sucrose agar
TCP	Toxin Co-regulated Pilus
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteas

TDH	Thermostable Direct Haemolysin
TLR5	Toll-like Receptor 5
UFC	Unité Formant Colonie
Vam	<i>Vibrio aesturianus</i> metalloprotease
VBNC	Viable But Non Cultivable
VHML	<i>Vibrio harveyi</i> Myovirus-Like
VHS1	<i>Vibrio harveyi</i> Siphovirus-Like 1
VpV	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> virus
WS	Withering Syndrome
WS-RLP	Withering Syndrome – Rickettsia Like Prokaryote
WSSV	White Spot Syndrome Virus

INTRODUCTION

Depuis les dernières décennies, de nombreuses maladies sont apparues en milieu marin et ont entraîné des mortalités conséquentes sur les populations d'invertébrés et de vertébrés. Les invertébrés marins, qui émettent de grandes quantités de gamètes, avec de forts taux de fécondité et de fortes dispersions larvaires, ont longtemps été considérés comme invulnérables à l'extinction (Hobday *et al.* 2001). Mais de plus en plus d'études rapportent le déclin et l'extinction locale d'espèces marines (Jamieson 1993; Myers & Worm 2003).

Les ormeaux sont un exemple de déclin associé au changement global. En Californie, depuis les trois à cinq dernières décennies, des maladies, combinées avec la surpêche locale, le réchauffement climatique et la modification de leur habitat, ont contribué à un déclin important de deux espèces d'ormeaux, l'ormeau blanc *Haliotis sorenseni* et l'ormeau noir *H. cracherodii*. Ces deux espèces ont d'ailleurs été classées «espèces en voie de disparition» respectivement en 2001 et 2006 (Hobday *et al.* 2001; Gruenthal & Burton 2008).

L'augmentation de température, conséquence du réchauffement climatique, peut directement influencer les populations marines en induisant un stress physiologique (Przeslawski *et al.* 2005; Li *et al.* 2007) ou en perturbant les cycles de reproduction naturels (Lawrence & Soame 2004). De nombreuses revues récentes mettent en avant l'importance de l'effet du changement climatique, sur les parasites et les pathogènes qui touchent les populations marines (Harvell *et al.* 2002; Ward *et al.* 2006; Bally & Garrabou 2007).

En Europe, le stock naturel d'ormeau (*Haliotis tuberculata*) est actuellement en déclin (Huchette & Clavier 2004), en lien avec l'émergence de nouvelles maladies. En effet, récemment, dans les stocks naturels et cultivés d'ormeaux, de nombreuses mortalités ont été associées au parasite *Haplosporidium* (Azevedo *et al.* 2006a; Balseiro *et al.* 2006), à des bactéries du genre *Rickettsia* (Azevedo *et al.* 2006b; Balseiro *et al.* 2006) ainsi qu'à des bactéries à Gram négatives du genre *Vibrio* (Nicolas *et al.* 2002). Une souche de *Vibrio carchariae* (synonyme de *Vibrio harveyi* (Gauger & Gomez-Chiarri 2002)) a été isolée de l'hémolymphes d'*H. tuberculata* pendant les mortalités massives qui ont touché les côtes et élevages français en septembre 1998 et 2000 (Nicolas *et al.* 2002). *V. carchariae* est connu pour provoquer des gastroentérites chez des poissons (Lee *et al.* 2002) et des mortalités chez les ormeaux, les crevettes ou les poissons (Liu *et al.* 1996b; Nishimori *et al.* 1998; Goarant *et al.* 2000; Nicolas *et al.* 2002; Aguirre-Guzman *et al.* 2004; Austin & Zhang 2006).

L'ormeau est un animal traditionnellement pêché en France, que ce soit « à pied » par les amateurs (entre le 1er septembre et le 15 juin, dans la limite de 20 ormeaux de taille supérieure à 90 mm), ou par des pêcheurs professionnels détenteurs d'une licence. Depuis quelques années seulement, l'aquaculture se développe pour alimenter les marchés et les restaurants. Malgré cet engouement pour l'ormeau, la production mondiale reste limitée, et les stocks naturels d'ormeau décroissent à travers le monde. En Europe, seules 10 tonnes d'ormeaux sont produites à l'heure actuelle. **Dans le souci de prévenir les épidémies et de pérenniser « l'halioticulture », il paraît indispensable de connaître précisément les pathogènes responsables des mortalités au sein des populations naturelles et d'élevage d'*Haliotis tuberculata*, afin de pouvoir les détecter, les prévenir et les combattre.**

L'émergence de maladies infectieuses représente un véritable frein au développement de l'aquaculture (Paillard *et al.* 2004b). Les élevages impliquent de fortes densités d'animaux et des conditions souvent favorables au développement de pathogène (températures élevées, abondance en alimentation et surplus de matière organiques). Ils sont ainsi fréquemment sujets à l'émergence de maladies et sont parfois même à la base de leur dissémination (exemple de l'herpès virus chez *H. laevigata* et *H. rubra* en Australie). Peu de moyens de lutte efficaces sont disponibles en élevage, et les principales perspectives résident dans la connaissance des maladies et dans leur prévention.

La compréhension d'une maladie ne se limite pas à la connaissance de son hôte et de son pathogène. Il faut considérer le déclenchement d'une maladie infectieuse comme la résultante d'interactions conduisant à un déséquilibre entre l'hôte et le pathogène. Celles-ci sont modulées par des facteurs internes (susceptibilité de l'hôte et virulence du pathogène) et externes (facteurs environnementaux). Ainsi l'expression d'une pathologie peut schématiquement être représentée au centre de 3 « zones d'influence » (Figure 1). Une maladie apparaît donc à un carrefour, où un hôte, rencontre un pathogène virulent, et ce, dans un environnement favorable au développement de la maladie.

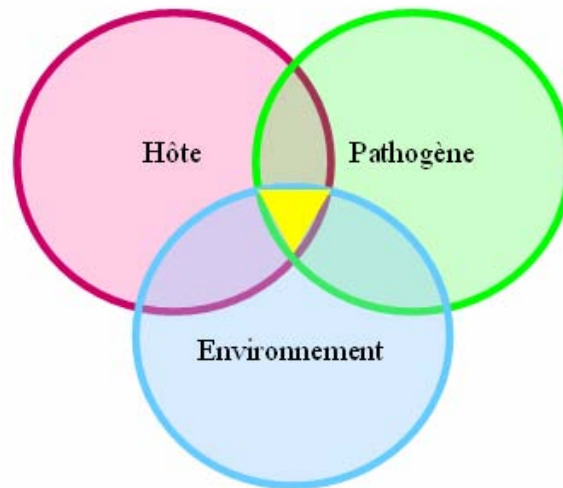


Figure 1 : Schéma des interactions hôte – pathogène – environnement.

Chaque cercle représente un des acteurs impliqué dans l'interaction : l'hôte (rose), le pathogène (vert) et l'environnement (bleu). La maladie se trouve à l'interaction des 3 zones d'influence (zone jaune centrale).

Cette thèse a pour objectifs de décrypter les mécanismes infectieux de la vibriose, modulés par les conditions environnementales. Elle s'est organisée sous trois volets :

1. Développement de protocoles standards de reproduction de la vibriose en conditions optimales, et de méthodes d'identification et détection du pathogène.
2. Caractérisation de la physiologie de l'hôte avant et pendant les périodes de mortalités (immunité, reproduction).
3. Recherche de potentiels facteurs de virulence du pathogène.

Ce manuscrit s'organise en trois grandes parties : une introduction contenant des rappels bibliographiques sur (1) les ormeaux, (2) les vibrions et (3) leurs interactions ; une partie résultats regroupant trois grands chapitres contenant les différents articles scientifiques issus de nos recherches ; et une partie conclusion et perspectives. Les chapitres de résultats sont organisés de la manière suivante :

Un **premier chapitre** présente tout d'abord la vibriose de l'ormeau européen *H. tuberculata*, ses principaux signes macroscopiques, ainsi que les conditions favorables à son développement et les tissus cibles de la bactérie. Pour cela, plusieurs approches ont été utilisées : une approche expérimentale utilisant des animaux à différents états de maturation gonadale, et à différentes températures ; et une seconde approche, sur le terrain, afin de confirmer le rôle de la température de l'eau de mer au moment de l'effort de reproduction des

ormeaux dans le développement de cette maladie (Article 1). Ceci nous a permis de standardiser un modèle expérimental, que nous avons pu, par la suite, explorer grâce à la construction et l'utilisation d'une souche fluorescente de *V. harveyi* (GFP). Lors de la reproduction des mortalités expérimentales, un suivi des bactéries dans l'eau de mer environnante et au sein d'ormeaux moribonds a pu être réalisé afin de pouvoir identifier des tissus infectés et le cycle du pathogène dans l'eau environnante, en interaction avec son hôte (Article 2).

Le **deuxième chapitre** décrit l'immunité (Article 3) et sa modulation, en lien avec le développement gonadique des ormeaux. Un suivi en milieu naturel du système immunitaire, en parallèle avec l'état reproducteur des animaux, a été réalisé afin de pouvoir faire le lien avec leur sensibilité accrue à cette période de l'année (Article 4).

Enfin, une **troisième partie** traite de la virulence de *V. harveyi* et de l'implication du plasmide pVCR1 dans celle-ci. Pour cela, différentes souches de *V. harveyi*, pathogènes ou non pour l'ormeau ont été testées *in vivo* et *in vitro*. L'efficacité et la reconnaissance par le système immunitaire des différentes souches, ont été évaluées suite à des contacts *in vitro*, à travers l'induction précoce du système immunitaire, via la phosphorylation d'effecteurs de la voie des MAP Kinases. Enfin, le rôle du plasmide dans la virulence a été étudié *in vivo* en évaluant la pathogénicité de souches non pathogènes transformées avec ce plasmide (Articles 5 et 6).

En annexe est présenté un article auquel j'ai également contribué (Article 7).

Article 1 : Travers, M.A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J. L., Koken, M. and Paillard, C. (Soumis à Global Change Biology). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming.

Article 2 : Travers, M.A., Barbou, A., Le Goïc, N., Huchette, S., Paillard, C. and Koken, M. (Soumis à FEMS Microbiology letters). Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamic analysis of abalone infection.

Article 3 : Travers, M.A., Da Silva, P. M., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S. M. H., Koken, M. and Paillard, C. (2008). Morphologic, cytometric and functional characterization of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 400-411.

Article 4 : Travers, M.A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M. and Paillard, C. (Soumis à *Fish and Shellfish Immunology*). Evidence of an immune depression in spawning period, at the basis of *Haliotis tuberculata* susceptibility to the pathogen *Vibrio harveyi*.

Article 5 : Travers, M.A., Le Bouffant, R., Friedman, C. S., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., Koken, M. and Paillard, C. (Soumis à *Journal of Cellular Biochemistry*). Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic isolates, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response

Article 6 : Travers, M.A., Barbou, A., Huchette, S., Paillard, C. and Koken, M. (En préparation). pVCR1, a plasmid responsible for the virulence of *Vibrio harveyi* strain ORM4 towards the European abalone, *Haliotis tuberculata*.

Article 7 : Le Bras, Y., Courtois, G., Travers, M.A., Huchette, S. and Van Wormhoudt, A. (Soumis à *Marine biotechnology*). Coexistence of two subspecies of the abalone *Haliotis tuberculata* along the European coasts: phylogeographic study revealed by mitochondrial marker COI.

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

1. L'ORMEAU

1.1. Phylogénie et répartition géographique

1.1.1 Les *Haliotidae*

L'ormeau est un mollusque gastéropode marin de l'ordre des Vetigastropoda. L'espèce servant de type au genre *Haliotis* est, selon les termes de Montfort (1810), "celui auquel on a donné le nom d'oreille d'âne (*Haliotis asinina*)". Le nom d'*Haliotis* vient du grec « halios » (la mer) et « ous, otis » (l'oreille). Les fossiles d'*Haliotidae* qui ont été trouvés à travers le monde ont permis d'évaluer l'apparition de ces mollusques au Crétacé supérieur (Maastrichtien - 65,5 à - 70,6 Ma). Des fossiles d'*H. tuberculata* datant du Miocène (- 5,75 Ma à -5,32 Ma) ont pu être retrouvés en France, en Italie, en Ukraine, en Bulgarie, en Hongrie, à Malte et dans les îles Canaries (Geiger 1999).

Jusqu'à récemment, la classification phylogénétique des ormeaux apparaissait complexe et variable selon les auteurs. La plupart des auteurs s'entendaient sur 75 ou 100 espèces distinctes et c'est Geiger (1999; 2000) qui, le premier, a ré-évalué ces familles et établi la liste des 56 espèces d'ormeau, se basant sur la morphologie (forme, aspect, couleur de la coquille, nombre et diamètre des pores, forme de la radula, de l'épipodium...) et sur la génétique (gène de la sperme-lysine, allozyme, et le gène de l'ARN ribosomal mitochondrial 16s).

Aucune des 56 espèces d'ormeau n'a de répartition globale, et certaines régions du monde abritent plusieurs espèces d'ormeau. Il faut compter neuf espèces endémiques en Australie, trois en Nouvelle-Zélande, cinq en Afrique du Sud, et six sur la côte ouest d'Amérique du Nord (Geiger 2000). Les espèces sont souvent proches morphologiquement, et ce sont des études génétiques qui ont permis de confirmer la divergence des espèces et d'étudier la répartition géographique de celles-ci.

Différents marqueurs génétiques ont permis l'étude de la diversité des *Haliotidae*: les allozymes comme la GPI (glucose 6-phosphate isomérase), la PGM (phospho-gluco mutase) la MDH (malate deshydrogénase), l'AAT (aspartate amino transférase) (Mgaya *et al.* 1995; Hamm & Burton 2000; Zuniga *et al.* 2000), les microsatellites (Evans *et al.* 2000; Selvamani *et al.* 2000; Tang *et al.* 2005), certaines séquences génomiques comme la sperme-lysine (Lee

& Vacquier 1995; Swanson *et al.* 2001; Clark *et al.* 2007) ainsi que des séquences mitochondriales comme la Cytochrome Oxydase I (COI) ou l'ARNr 16s (Hamm & Burton 2000; An *et al.* 2005; Le Bras *et al.* Submitted Article 7 présenté en annexe). La Figure 2 illustre la diversité des *Haliotidae*, à travers un arbre phylogénétique construit à partir des séquences concaténées de la sperme lysine, de l'ARN ribosomique 16s, et des allozymes.

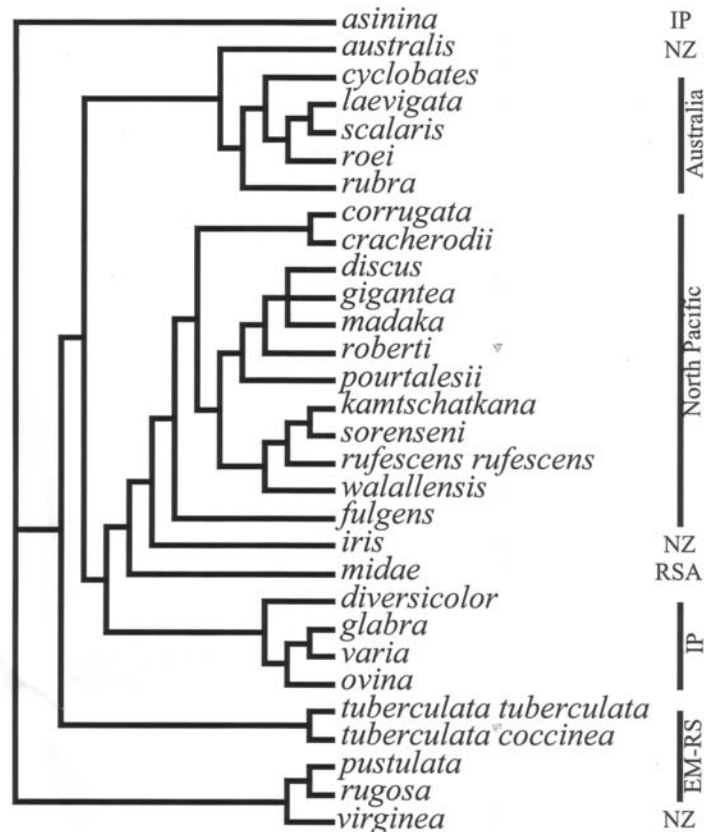


Figure 2: Arbre phylogénétique des *Haliotidae* (selon Geiger, 1999)

Cet arbre est basé sur les séquences concaténées des allozymes, du gène de l'ARN ribosomal 16s et de la sperme lysine. EM-RS : Europe, Méditerranée – Mer rouge ; IP : Indo-Pacifique ; NZ : Nouvelle Zélande ; RSA : Afrique du Sud

1.1.2 *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758)

Phylum	<i>Mollusca</i>
Classe	<i>Gasteropoda</i>
Sous-classe	<i>Orthogastropoda</i>
Ordre	<i>Vetigastropoda</i>
Superfamille	<i>Halioidea</i>
Famille	<i>Haliotidae</i>
Genre	<i>Haliotis</i>
Espèce	<i>tuberculata</i>

H. tuberculata est présent exclusivement en Europe et Afrique du Nord (Huchette & Clavier 2004). On le retrouve des îles Anglo-Normandes au nord jusqu'au Sénégal au sud, ainsi qu'aux îles Canaries et en Méditerranée. Sa répartition est illustrée sur la Figure 3.

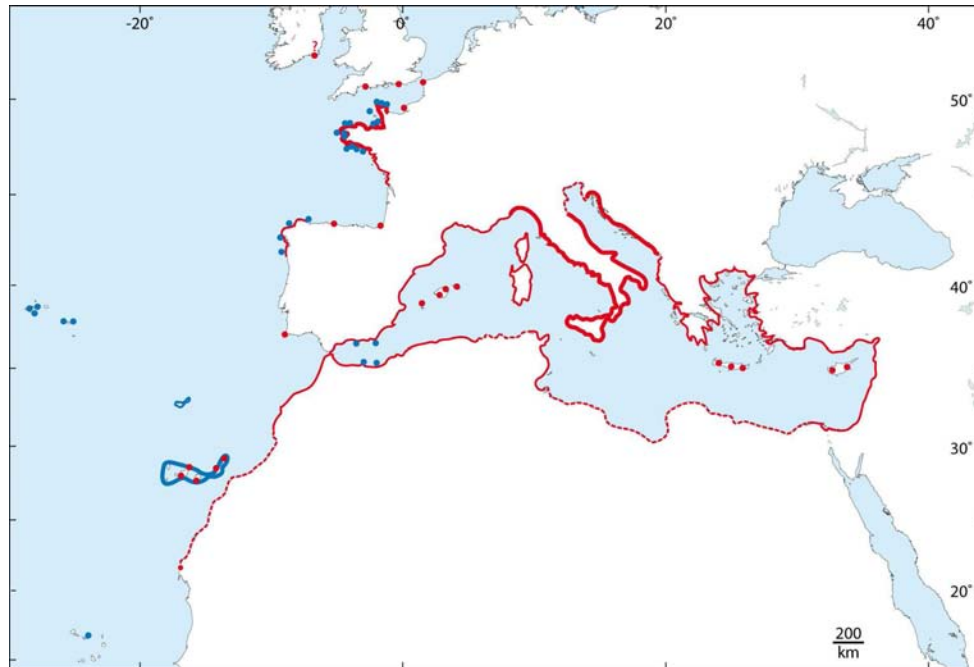


Figure 3 : Répartition d'*H. tuberculata* (adapté de Geiger, 2000 et Le Bras *et al.*, soumis)

La répartition principale de chaque sous-espèce est présentée en trait plein, les points correspondant à une distribution plus sporadique. La présence d'*H. tuberculata tuberculata* est signalée en rouge, et la présence d'*H. tuberculata coccinea* en bleu.

Deux sous-espèces d'*H. tuberculata* sont recensées en Europe (Geiger 1999, 2000; Le Bras *et al.* Submitted) : *H. tuberculata tuberculata* (Linnaeus, 1758) et *H. tuberculata coccinea* (Lamarck, 1822) (Figure 3). Les critères permettant de différencier les deux sous-espèces sont d'ordre génétique : les séquences de la sperme-lysine diffèrent seulement de 4 acides aminés entre *H. tuberculata coccinea* et *H. tuberculata tuberculata*, alors que la plupart des espèces diffèrent de 15 à 20 acides aminés. Selon Geiger, la morphologie des coquilles seraient réellement distinguables (Figure 4). Toutefois, cette différence morphologique est à prendre avec précaution car ce dernier n'avait comparé que des coquilles d'*H. tuberculata coccinea* venant des îles Canaries avec des coquilles d'*H. tuberculata tuberculata* venant de Bretagne, coquilles venant d'animaux d'environnements très différents.

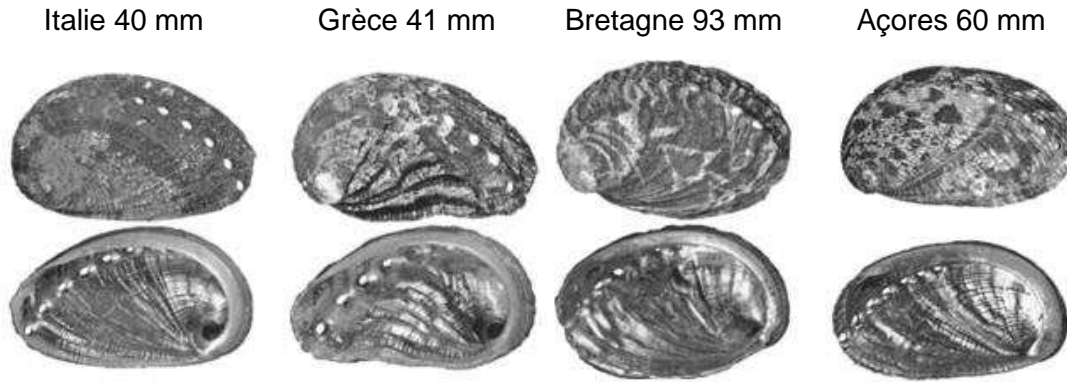


Figure 4: *H. tuberculata* – coquilles (selon Geiger, 1999)

Ces coquilles ont diverses origines géographiques (Italie, Grèce, Bretagne et Açores) et illustrent la diversité morphologique de l'espèce *H. tuberculata*.

1.2. Biologie de l'ormeau

1.2.1 Habitat

L'ormeau habite généralement entre +1 et -10 m par rapport au zéro des cartes (Croft, 1929), dans « toute anfractuosit durable, située à faible profondeur, dont les parois sont constituées, au moins en partie de substrat dur », selon Clavier et Richard (1985). Un tel habitat procure une protection aux ormeaux contre les prédateurs. La densité des ormeaux est principalement fonction des caractéristiques du milieu, et une stratification bathymétrique des tailles a été mise en évidence entre 0 et 5,5 m dans la région de Saint-Malo, les individus les plus jeunes se répartissant préférentiellement à faible profondeur (Clavier & Richard 1985). L'ormeau, qui vit généralement « collé » sous les rochers, se déplace peu dans le milieu naturel (Figure 5).



Figure 5 : *H. tuberculata* dans son milieu naturel

Photographie réalisée par T. Abiven (SYMEL).

1.2.2 Anatomie

Cette partie s'inspire principalement des travaux de Croft (1929) et de Bevelander (1988), et s'attache à décrire les différents organes de l'ormeau, à savoir manteau, système musculaire, respiratoire, coelomique, circulatoire, digestif, nerveux et sensoriel.

L'ormeau est un gastéropode à coquille aplatie de forme ovoïde dont la dernière spire est très développée (Figure 6 ou Figure 8). La plupart des espèces d'ormeau sont de petites tailles (*H. diversicolor supertexta* n'excède pas 50 mm), la plus grande espèce étant l'ormeau américain *H. rufescens* (jusqu'à 275 mm). *H. tuberculata* mesure quant à lui en moyenne 77 mm à 5 ans (Clavier & Richard 1985), et les plus grands spécimens peuvent atteindre 135,5 mm (Huchette, communication personnelle). La coquille couvre entièrement l'animal et comporte des pores respiratoires (5 à 7 trous en moyenne), qui permettent la respiration, l'excrétion et l'émission des gamètes.

L'ormeau possède, à proximité des yeux, deux tentacules céphaliques à rôle préhensible (Figure 6). La bouche ventrale est munie d'une radula, armée de rangées de dents.

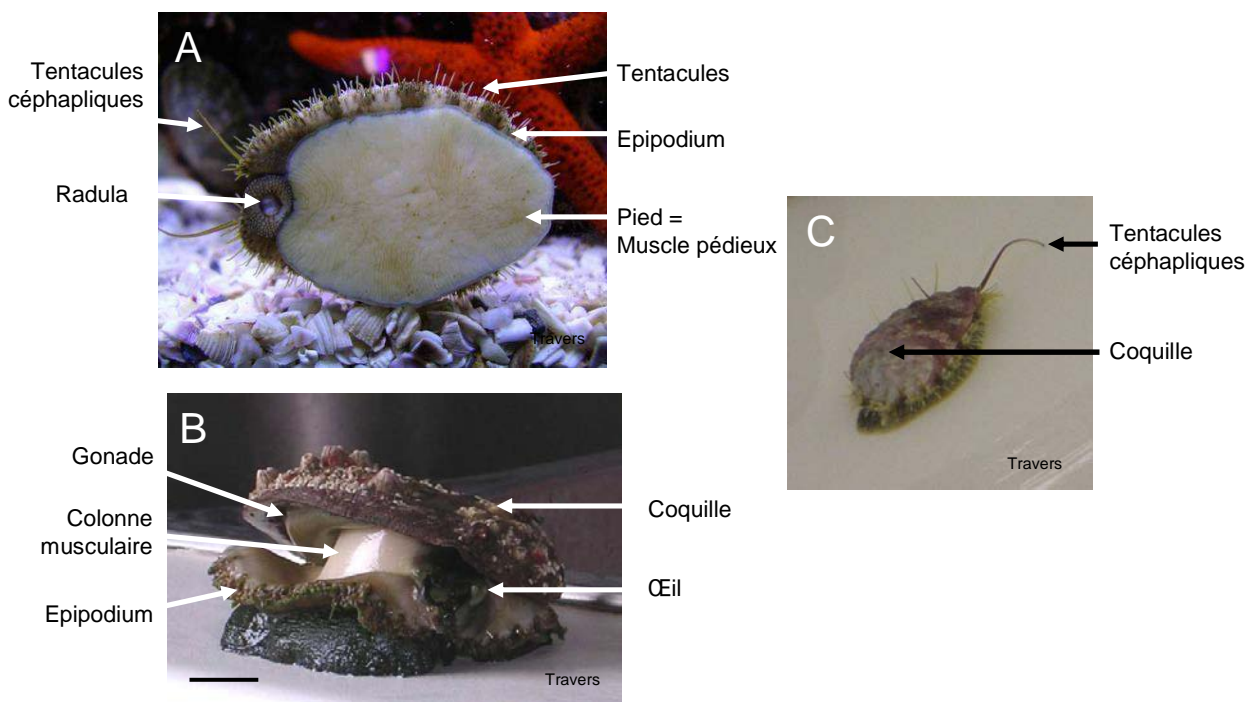


Figure 6: *H. tuberculata* - vues ventrale et dorsale

Ormeaux, vue ventrale (A), vue faciale (B) et vue dorsale (C). Les principaux organes visibles sont indiqués. Barre = 2cm.

Manteau

Le manteau est attaché à la coquille, et ses lobes antérieurs droits et gauches permettent la fermeture de la cavité respiratoire. Le manteau permet la formation de la coquille et la nacre (Suja & Dharmaraj 2005) et délimite les cavités internes de l'animal. La coquille des mollusques est composée de matière organique et de matière minérale. Elle est formée de deux couches : une fine couche nacréée interne (cristaux d'aragonite) et une couche externe prismatique composée de calcite et d'aragonite. La synthèse de la coquille et sa réparation sont sous le contrôle du manteau qui se rétracte et se positionne autour des zones à réparer. Le manteau est également capable de sécréter les protéines nécessaires à la formation de la coquille, et est une zone de transit pour les carbonates de calcium synthétisés par les cellules sous épithéliales (Jolly *et al.* 2004; Fleury *et al.* 2008).

Cet épithélium contient des cellules glandulaires, pigmentaires et sensorielles. Un des développements spéciaux du manteau est la glande hypobranchiale ou glande à mucus, située autour des branchies (particulièrement développée à gauche). La quantité de mucus sécrété dans la chambre respiratoire augmente rapidement en cas d'irritation. Il est produit pour protéger les cténidies (ou branchies), et pour entourer et éliminer les débris venant de l'anus et des reins.

Système musculaire

Le pied (= muscle pédieux) de l'animal est très développé, et représente en moyenne 40% du poids total de l'animal (Figure 6). Il est lubrifié par du mucus sécrété, ce qui permet le déplacement de l'ormeau, pouvant atteindre des vitesses de 20-50 cm/min pour les petits individus et 50-80 cm/min pour les plus gros. Le pied est attaché à la coquille par une colonne musculaire, et il est entouré d'organes sensoriels sur l'épipodium appelés tentacules. Le muscle est composé de fibres allongées et d'une forte proportion de fibres de collagène (jusqu'à 4,2% de son poids) qui diminue selon la saison, en particulier en été, au moment de l'effort de reproduction des animaux (Yoneda *et al.* 2000).

La puissance du pied des ormeaux peut être observée en plaçant un ormeau sur le dos. Celui-ci est alors capable de se retourner rapidement, qu'il soit en eau ou non. Ce retournement est rendu possible par des mouvements violents du pied à 180°. Une fois un substrat trouvé et une petite portion du pied adhérente, le pied très musclé de l'ormeau permet son retournement rapide (Figure 7).



Figure 7 : Retournement d'*H. tuberculata*.

Photographies d'un ormeau sur le dos en train de se retourner. SCEA France Haliotis.

Autour de la colonne musculaire se trouve la masse viscérale comprenant les branchies, le cœur, les reins, l'intestin, la glande digestive et la gonade (qui entoure la glande digestive et prend une couleur crème chez les mâles et gris-vert chez les femelles (Figure 8)). Ces différents organes ainsi que leurs fonctions seront décrits dans les pages qui suivent.

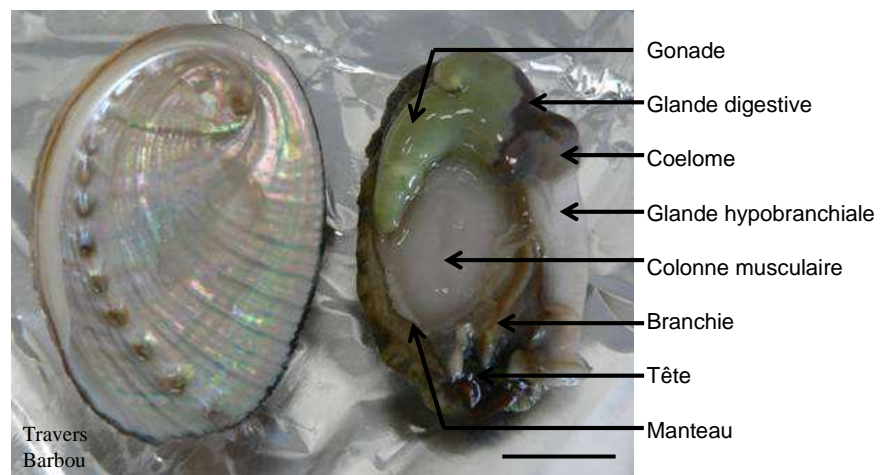


Figure 8 : *H. tuberculata* - vue décoquillée d'une femelle

Les principaux organes visualisables sur un animal décoquillé sont indiqués (Barre = 1 cm)

Systeme respiratoire

Les cténidies ou branchies sont les organes spécialisés de la respiration (Figure 8), mais le manteau, comme chez de nombreux gastéropodes et lamellibranches, prend part au processus. En effet, la riche vascularisation de ce tissu rend l'oxygénation de l'hémolymphe facile. L'eau rentre dans la cavité branchiale, au niveau de la tête, côté droit, où elle baigne les cténidies, permettant ainsi l'oxygénation branchiale. Puis, chargée de produits d'excrétion et/ou produits génitaux venant des reins ou de l'anus, l'eau est rejetée par les perforations de

la coquille par l'action ciliaire. Ce mouvement est aidé par les contractions musculaires qui induisent un rapprochement saccadé de la coquille (surtout observé en période de ponte).

Le coelome

Le coelome des *Haliotidae* est représenté seulement par la cavité péricardique et par les petites cavités gonadales et rénales. Le péricarde peut être observé dès l'ablation de la coquille. Le coeur est composé de deux auricules, derrière les cténidies, et d'un ventricule, traversé par l'intestin, comme chez les lamelibranches. Les battements du coeur peuvent également être vus à travers cette cavité transparente (27 à 36 battements par minute). Le débit sanguin assuré par le péricarde a pu être calculé chez *H. cracherodii* grâce à l'utilisation de microsphères radioactives. Il a été estimé à 100-150 ml. kg⁻¹. min⁻¹, ce qui est relativement élevé, en comparaison avec les mammifères (Jorgensen *et al.* 1984).

Système circulatoire

L'hémolymphe des ormeaux est pigmentée de couleur bleue, de part la présence de l'hémocyanine, transporteur extracellulaire de l'oxygène présent au niveau plasmatique. Elle contient des hémocytes, cellules circulantes (décrites dans la partie immunité paragraphe 1.3, p37). Le tissu lymphoïde est supposé diffus chez les *Haliotidae*, au niveau des vaisseaux efférents des cténidies, à proximité du manteau et dans la région abdominale. Mais ceci a été largement discuté et remis en question (Hooper *et al.* 2007a).

L'hémolymphe désoxygénée passe par le rein droit avant d'aller au niveau des cténidies. C'est à ce niveau que les produits d'excrétion sont éliminés, et l'hémolymphe, oxygénée dans les branchies et le manteau. Le système circulatoire de l'ormeau est composé de sinus, d'artères et de veines, parcourant le corps de l'animal.

Système digestif

La bouche et l'anus sont situés dans la partie antérieure du corps. La position en avant de l'anus est due à la torsion primitive des gastéropodes. La bouche est composée de lèvres papillées, d'une mâchoire en chitine et d'une large radula. Les ormeaux broutent des macroalgues, dont les fragments sont râpés par la radula, contrôlée par l'appareil odontophore. Les tentacules céphaliques et les lèvres papillées sélectionnent les aliments, et le muscle pédieux aidé des lèvres permet la fixation de ceux-ci, pour permettre l'action de la radula.

Le milieu acide nécessaire à la digestion est fourni par les glandes salivaires. Le système digestif est composé d'un œsophage, d'un estomac et d'un long intestin qui offre une grande surface d'absorption, et passe derrière le péricarde. Le système digestif est incapable de péristaltisme (à part dans la partie étroite de l'œsophage), et les mouvements sont assurés par des cils. L'alimentation des ormeaux sera décrite plus bas (paragraphe 1.2.4, p 36).

Système nerveux

Le système nerveux des ormeaux est un système primitif ganglionnaire, marqué par une absence de concentration des ganglions nerveux. Ces centres consistent en (1) une paire de ganglions cérébroïdes réunis par la commissure dorsale au-dessus de l'œsophage, (2) une paire de ganglions sous-oesophagiens liés l'un à l'autre par une commissure sous œsophagienne, et aussi (3) à deux ganglions pleuro-pédieux qui, postérieurs aux cérébroïdes, leur sont unis par une paire de connectifs cérébro-pleuraux et cérébro-pédieux (Croft 1929).

Système sensoriel

L'épipodium est plus développé chez *Haliotis* que chez aucun autre mollusque, il a d'ailleurs été qualifié d'hypertrophié (Geiger 1999) ([Figure 6](#)). Ce tissu est très innervé, très vascularisé et porte les tentacules épipodiales. Des cellules neuro-épithéliales agrégées au niveau d'organes « sensoriels » sont particulièrement présentes chez les *Haliotidae*. C'est ainsi que les tentacules céphaliques (mesurant jusqu'à 10 cm) et épipodiales confèrent à l'ormeau un sens du toucher développé. Les animaux sont ainsi capables de détecter des changements chimiques et thermiques de leur environnement, et d'explorer leur milieu.

L'ormeau a aussi un organe olfactif composé d'une paire d'osphradies, placée symétriquement à l'entrée de la cavité respiratoire. Elles permettraient l'examen de l'eau avant son utilisation pour la respiration par les cténidies. En présence d'eau sale, la chambre respiratoire serait ainsi fermée par la coquille et le manteau.

Les yeux de l'ormeau sont situés à l'extrémité d'une paire de tubercules optiques, près des tentacules céphaliques ([Figure 6](#)). Ils ne sont pas clos par une cornée, mais ont une lentille cristalline (Bevelander 1988).

Systeme excrétoire

Une paire d'organes rénaux est présente, mais les organes sont asymétriquement développés, et diffèrent autant en structure qu'en fonction. Ils sont distribués de chaque côté du péricarde, mais ne communiquent pas entre eux. Le rein droit est le plus grand ; il excrète des produits solides et liquides, chargés en acide urique. Il est parcouru par la plupart des veines qui passent à travers le portail rénal. Le rein droit est ainsi l'organe dépuratoire.

Le rein gauche, réduit, a été renommé sac papillaire, et a une fonction rénale modifiée, avec certainement de nouvelles fonctions. Il est situé entre la glande hypobranchiale et le péricarde, et contient de nombreuses cellules immunitaires phagocytaires. Croft dit elle-même de sa circulation et de sa fonction « It is curious and difficult to understand » (Croft 1929).

1.2.3 Reproduction et développement

Reproduction

L'ormeau est un animal gonochorique (sexes séparés), et la couleur de la gonade en période de reproduction permet un sexage rapide et non destructif (couleur crème chez les mâles et gris-vert chez les femelles) (Figure 8 pour les femelles). Mais en période de repos sexuel, la couleur de celle-ci ne permet pas de distinguer les deux sexes. Dans le milieu naturel, le sexe ratio est proche de 1 :1 (Cochard & Flassh 1981 et observations personnelles).

Six stades de développement gonadal peuvent être décrits chez le mâle comme chez la femelle selon Sobhon (1999): le stade 1 pré-prolifératif, le stade 2 prolifératif, le stade 3 de développement avancé, le stade 4 correspondant au stade mature, le stade 5 de ponte partielle, et le stade 6 de ponte totale.

Au niveau histologique, chez la femelle, le stade 1 correspond à une gonade non différenciée, avec peu ou pas d'épithélium germinal entre l'épiderme extérieur et la glande digestive (Figure 9A). Dans le stade 2 (stade prolifératif), des amas d'ovogonies situés entre des ovocytes pédonculés adhèrent à la paroi des trabécules. Dans le stade 3, l'ovaire en maturation se remplit d'ovocytes de tailles différentes (en moyenne 25 µm de diamètre, Figure 9B). Le stade 4 correspond au stade dit mature, les ovocytes mûrs mesurent plus de 110 µm de diamètre et sont libres des trabécules (Figure 9C). Dans le stade 5 (ponte partielle) l'ovaire contient des densités réduites d'ovocytes matures par rapport au stade 4, et sont également plus petits. Enfin, le stade 6 (ponte totale, Figure 9D) est caractérisé par une absence de gamètes matures, et parfois la présence d'ovocytes atrétiques.

Chez le mâle, différentes catégories de gamètes sont à prendre en compte : les spermatogonies qui se multiplient en stade 2, et se différencient en spermatocytes I et II, spermatides puis spermatozoïdes, qui s'accumulent dans les stades 3 et 4 de développement.

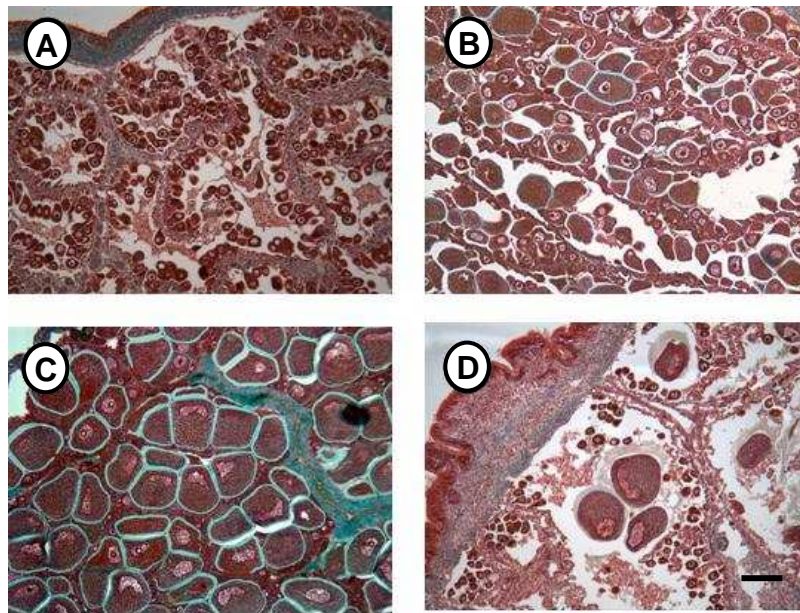


Figure 9 : Aspect histologique de la gonade femelle à divers stades du cycle sexuel

A. Stade 1 préprolifératif ; B. Stade 3 de développement avancé ; C. Stade 4 de réplétion maximale ; D. Stade 6 après ponte. Barre = 100 μ m. Photo : M.A. Travers

Quatre types de facteurs conditionnent le cycle reproducteur des ormeaux (Belhsen 2000) : (1) La photopériode, qui agit sur le déclenchement de la gamétogenèse. (2) La température qui joue, elle, un rôle sur la vitesse de développement des gonades. La période de ponte peut ainsi être prédite par le calcul des degrés-jours (1450 - 1500 degrés-jours au delà de 7°C). (3) La quantité de nourriture disponible, qui fournit l'énergie nécessaire à la synthèse des gamètes. Et enfin, (4) des facteurs internes, de type hormonal, qui influencent la gamétogenèse et permettent la synchronicité des pontes en milieu naturel.

En Bretagne, la période de ponte chez *H. tuberculata* s'étend de juin à octobre. La réinitiation de la gamétogenèse a lieu entre février et mars. L'ormeau peut avoir plusieurs cycles de maturation / émission des gamètes. Les pontes ont lieu généralement sur quelques semaines, selon le secteur géographique. Elles sont asynchrones d'un site à l'autre, mais synchrones à l'intérieur d'un même site (Belhsen 2000).

Développement larvaire

La rencontre des gamètes se fait librement dans l'eau de mer et l'oeuf fécondé (diamètre moyen de 210 μm) donne naissance en quelques heures (10 h en laboratoire à 22°C) à une larve trochophore (Courtois *et al.* 2007). Cette larve est attirée par la lumière et nage près de la surface de l'eau. Elle se transforme en une journée environ en une larve véligère qui fera partie du plancton pendant une durée variable (de 3 à 10 jours). A l'issue de cette période, la larve gagne le fond et devient benthique (Figure 10).

Les facteurs induisant la métamorphose semblent divers, mais les principaux seraient d'ordre biochimique et auraient 2 origines. (1) le GABA (l'acide gamma amino-butérique) produit par les algues rouges (Morse *et al.* 1979); (2) la présence de traces muqueuses laissées par les ormeaux en déplacement, qui contiendraient également du GABA (Laimek *et al.* 2008).

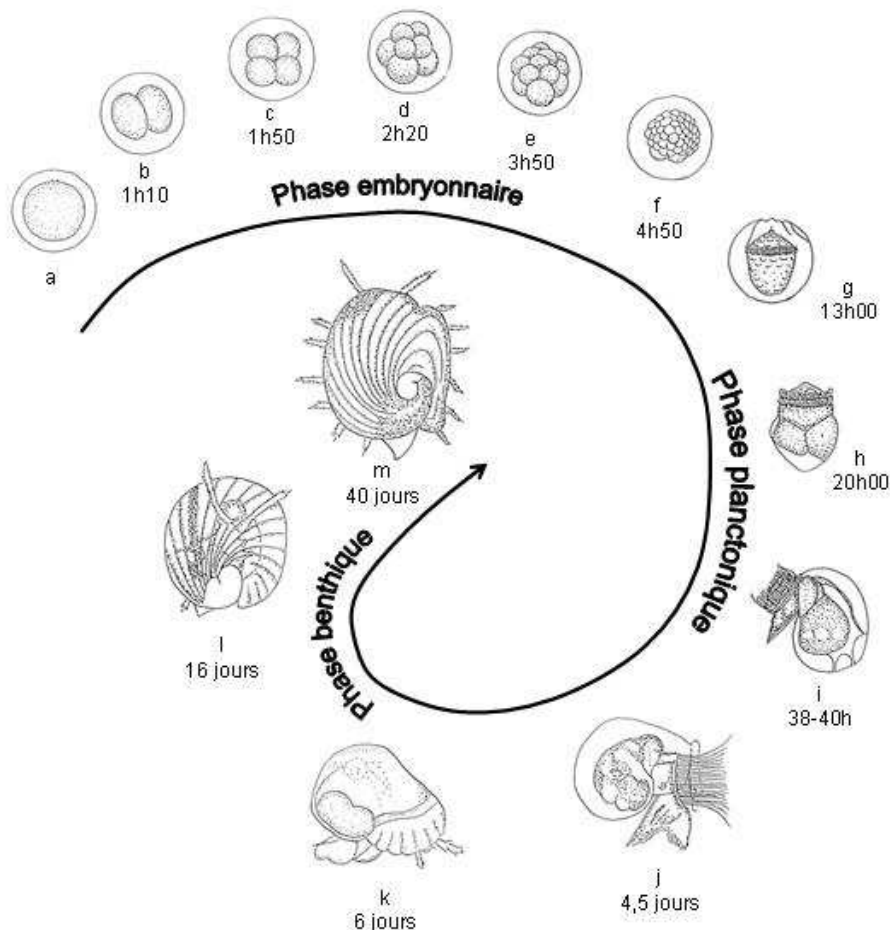


Figure 10 : Développement larvaire (adapté de Belhsen, 2000)

a : oeuf (\varnothing 0,21 mm) ; b : première division ; c : 2^{ème} division ; d : 3^{ème} division ; e : 4^{ème} division ; f : stade morula ; g : larve trochophore (\varnothing 0,20 mm) ; h : larve véligère (\varnothing 0,21 mm) ; i : larve véligère après éclosion ; j : larve véligère à la fin du stade planctonique (\varnothing 0,26 mm) ; k : larve rampante (\varnothing 0,27 mm) ; l : larve rampante (0,47 mm de longueur) ; m : juvénile (2,2 mm de longueur).

Il est important de noter, d'une part, que la fécondité potentielle des ormeaux est positivement corrélée avec leur poids, et que, d'autre part, la fécondation semble dépendre d'une concentration minimale de spermatozoïdes dans l'eau de mer (Baker & Tayler 2001) et par voie de conséquence d'une densité minimale d'ormeaux en un lieu donné (échec de recrutement pour des populations d'*H. laevigata* quand les densités étaient inférieures à 0,3 animaux/m², ce qui équivaut à des distances moyennes entre voisins les plus proches de 1 m et 2 m (Babcock & Keesing 1999; Huchette 2003). Cela implique aussi qu'en cas de surpêche en deçà de cette densité seuil, le stock d'ormeaux pourrait connaître un véritable effondrement sans recours possible.

Croissance

L'ormeau a une croissance lente (Basuyaux 1997) et extrêmement variable d'un individu à l'autre. Il faudrait à certains individus au moins 6 années pour atteindre la longueur minimale de capture autorisée en France (90 mm), alors que d'autres atteignent cette taille en 2 ans et demi (Huchette, données non publiées). En élevage en milieu contrôlé, dans les conditions optimales à leur croissance, les animaux atteignent 15-38 mm en 1 an, 38-72 mm en 2 ans et 57-90 mm en 3 ans (min-max de la cohorte) (Basuyaux 1997).

Il est important de noter que 18°C correspond à la température à laquelle le métabolisme d'*H. tuberculata* est le plus actif (McBride *et al.* 2001).

Dans le milieu naturel, la croissance n'est pas continue tout au long de l'année et deux arrêts majeurs peuvent se produire, un en hiver, à lier à la faible présence algale et un en été, pendant la période de reproduction. Ces facteurs ne sont pas les seuls à influencer la croissance des ormeaux dans le milieu, la densité joue également un rôle régulateur très important à tous les stades de vie étudiés par Huchette (2003) chez *H. laevigata* et *H. rubra*, en élevage et dans le milieu naturel.

1.2.4 Alimentation

L'ormeau est un animal essentiellement herbivore qui se nourrit de macro-algues souvent dérivantes. Il peut en consommer de 10 à 20% de sa masse par jour (Basuyaux 1997). Il semble préférer les entéromorphes, et l'algue rouge *Palmaria palmata*, qui lui permet une bonne croissance. Cependant, les régimes mixtes *P. palmata* + *Laminaria digitata* permettraient de gagner sensiblement en croissance (Basuyaux 1997).

Dans le milieu naturel, la qualité des algues et leur composition biochimique varie (Mai *et al.* 1994), et la relation alimentation – croissance peut s’avérer très complexe car, outre la quantité, il faut aussi prendre en compte la texture de l’aliment, son appétence, sa toxicité et sa digestibilité. Cette relation varie avec l’âge des individus et le développement de leur radula (Kawamura *et al.* 2001; Johnston *et al.* 2005). Leur flore bactérienne évolue également, et l’établissement de certaines bactéries favorise la digestibilité de certains aliments. La flore intestinale des ormeaux assiste la digestion des polysaccharides des algues, en particulier les alginates, les laminarines, les agars, les carraghénanes et la cellulose (Erasmus *et al.* 1997). Une modification de la flore intestinale des ormeaux a ainsi pu être notée lors de changements d’alimentation (Tanaka *et al.* 2003). L’importance de la présence de *Vibrio halioticoli* (représentant 40 à 65% de la flore intestinale des ormeaux) a été démontrée dans plusieurs études : elle permet la transformation d’alginate, composé majeur des algues broutées par les ormeaux, en acide acétique (Sawabe *et al.* 1998; Sawabe *et al.* 2003). C’est finalement une alimentation en macro-algues, supplémentée de micro-algues qui convient le mieux aux très jeunes juvéniles (Daume 2006) et favorise la transition alimentaire.

1.3. L’immunité

Chez les mollusques, le système de défense est assuré essentiellement par les cellules et les molécules véhiculées par l’hémolymphe (et les fluides extra-palléaux dans le cas des bivalves) (Allam & Paillard 1998; Paillard *et al.* 2004a). Ces fluides contiennent des cellules, les hémocytes et une panoplie de facteurs humoraux (Roch 1999; Chu 2000; Bachère *et al.* 2004). L’immunité des mollusques est une immunité innée, sans phénomène de mémoire. Ce dernier postulat est actuellement remis en question, et sera discuté ici (paragraphe 1.3.5, p50).

Très peu de données étant disponibles sur l’immunité des ormeaux, cette partie de l’introduction s’appuiera principalement sur les connaissances que nous avons des mollusques bivalves.

1.3.1 Les hémocytes

Les hémocytes sont les cellules actives du système immunitaire. Cellules circulantes, elles peuvent s’infiltrer dans les tissus pour rejoindre le site d’infection, mais sont également impliquées, chez les mollusques bivalves, dans de nombreuses fonctions comme la digestion, le transport de nutriments, la réparation tissulaire et coquillière, et la résorption gonadique

(Sparks & Morado 1988; Cheng 1996). De nombreuses publications traitent de la classification des hémocytes, chez les bivalves principalement (Pour revues Cheng 1981; Hine 1999), et chez quelques gastéropodes, mais des controverses subsistent. En effet, selon le mode de classification (morphologique, cytologique ou enzymatique), la classification diffère. De plus, l'origine de ces cellules reste floue. Au-delà de la présence ou de l'absence d'un tissu hématopoïétique, l'existence de lignées cellulaires indépendantes (granulaires et agranulaires) reste très discutée (Cheng 1981; Auffret 1988; Hine 1999). Chez l'ormeau, une seule étude rapporte l'existence de granulocytes, mais ceux-ci, observés en microscopie électronique, diffèrent fortement des granulocytes typiques des bivalves (Sahaphong *et al.* 2001).

Il existe plusieurs groupes d'hémocytes décrits chez les bivalves : les blastes, ou cellules souches ; les granulocytes, cellules au cytoplasme rempli de granules ; et les hyalinocytes ou cellules au cytoplasme transparent (Cheng 1981). Leur proportion et leur taille varient selon les espèces. L'huître *Crassostrea gigas* possède par exemple de nombreux granulocytes et deux types de hyalinocytes, les grands et les petits (Hégaret *et al.* 2003a).

Chez les gastéropodes, les études portent principalement sur les animaux d'eau douce, et ne rapportent qu'un type cellulaire. Chez *H. tuberculata*, aucune information n'est disponible sur les différentes cellules présentes et sur leurs fonctions respectives.

1.3.2 L'immunité cellulaire

Les hémocytes assurent l'immunité cellulaire ; ils sont capables de former des pseudopodes, de s'agréger, d'encapsuler ou d'entourer des particules de grande taille, de phagocyter des particules de petite taille et de produire des espèces oxygénées réactives (Cheng 1981; Hine 1999).

La phagocytose

La phagocytose est un processus qui permet d'éliminer des particules de petite taille (virus, bactéries, particules organiques...). Elle comprend plusieurs étapes : la reconnaissance des particules étrangères, l'attachement, la formation de pseudopodes, l'ingestion dans le phagosome ou endocytose, la dégradation par des mécanismes dépendants ou indépendants de l'oxygène (via la formation d'un phagolysosome qui contient des enzymes comme la

phosphatase acide, le lysozyme et des hydrolases) et l'élimination des produits de dégradation (Bayne 1990) (Figure 11). Ces différentes étapes sont décrites ci-dessous.

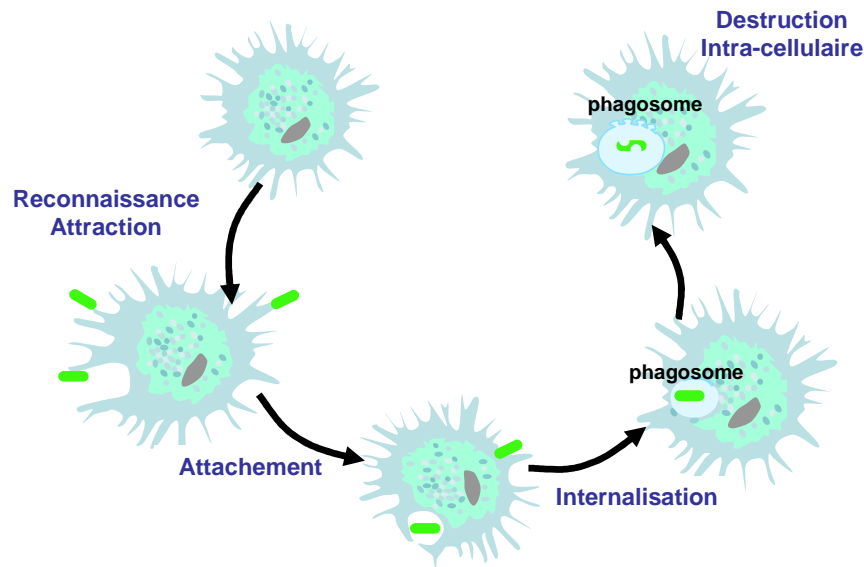


Figure 11 : Schéma récapitulatif du processus de phagocytose chez des cellules hémocytaires de mollusque en contact avec des microorganismes (vert)

La reconnaissance des particules étrangères par les hémocytes passe par un système de récepteurs membranaires, capables de reconnaître des motifs bactériens (Humphries & Yoshino 2003). Chez les mollusques marins, des molécules de reconnaissance comme les lectines ou les protéines de liaison au LPS (lipopolysaccharides composant la paroi bactérienne) ont été identifiées, mais peu de récepteurs directs connus chez les vertébrés, comme les scavengers ou les toll-like.

Les lectines sont des glycoprotéines synthétisées et secrétées par les hémocytes, capables de se lier à la surface des microorganismes, avec un large spectre de reconnaissance. (Wang *et al.* 2008c). Les lectines permettent l'agglutination des microorganismes, l'opsonisation par liaison à la membrane des hémocytes, et enfin la reconnaissance, quand elles sont liées aux membranes hémocytaires (Chu 2000). Il existe trois grandes classes de lectines chez les mollusques : les lectines de type C, les pentraxines et les galectines (Pour revue Vasta *et al.* 1994; Vasta & Ahmed 1996). De nombreuses molécules ont pu être identifiées chez les bivalves, huîtres, palourdes et moules (Olafsen *et al.* 1992; Olafsen 1995; Tunkijjanukij *et al.* 1997; Kang *et al.* 2006) mais, chez les ormeaux, seule une lectine de type C (Ca^{2+} dépendant) a été décrite (CHLd) chez *H. diversicolor* (Wang *et al.* 2008c). Cette protéine de 151 acides aminés est exprimée principalement dans le tractus digestif, les

branchies et le manteau des animaux non infectés. L'expression de son ARN messager est induite par des infections avec *Vibrio alginolyticus*. De plus, une protéine recombinante exprimée dans *Echerichia coli* a permis de valider sa capacité d'agglutination envers *V. alginolyticus*, mais pas contre toutes les bactéries à Gram négatives (Wang *et al.* 2008c).

De fortes différences entre les mollusques gastéropodes et les mollusques bivalves ont été notées par Yakovleva *et al.* (2001) en termes de concentrations en agglutinines et de poly-réactivité. Les mollusques gastéropodes auraient moins de lectines, qui seraient moins diverses et plus spécifiques d'un certain type de sucre (Yakovleva *et al.* 2001). Néanmoins, cette étude s'appuie principalement sur les gastéropodes *Lymnaea* sp., *Helix* sp. et *Biomphalaria* sp., du fait du peu de données disponibles pour l'orveau.

Des protéines de liaison au LPS ont été décrites chez les bivalves : Cg-LBP (*C. gigas* LPS-binding protein) (Gonzalez 2005) et Cg-BPI (*C. gigas* Bacterial permeability increasing protein) (Gonzalez *et al.* 2007). Les LBP sont des protéines plasmatiques qui peuvent reconnaître spécifiquement les LPS des bactéries Gram-négative, et signaler leur présence en se liant à un récepteur membranaire (CD14 chez les mammifères) qui peut alors transduire le signal (via son interaction avec le toll-like receptor 4 ou TLR4 chez les mammifères). Les BPI sont des protéines contenues dans les granules des cellules immunitaires, à action microbicide. Les transcrits de *Cg-bpi* sont induits en réponse à une stimulation bactérienne, et détectés dans les cellules épithéliales des tissus en contact avec l'environnement externe (manteau, branchies, tractus digestif...) (Gonzalez *et al.* 2007). Aucune de ces molécules n'a été décrite, à ce jour, chez l'orveau.

L'activation des voies de reconnaissance conduit à la mobilisation des voies de signalisation intracellulaire (Canesi *et al.* 2002b). Plusieurs voies peuvent être activées : (1) la voie NF- κ B qui est bien caractérisée chez l'huître creuse (Gueguen *et al.* 2003), et dont des homologues ont été trouvés chez *H. diversicolor supertexta* (Jiang & Wu 2007) ; (2) la voie des mitogen-activated kinases ou MAP Kinases (voie ERK, JNK ou p38) caractérisée chez *Littorina littorea* (Iakovleva *et al.* 2006b) et *Biomphalaria glabrata* (Humphries & Yoshino 2006). Chez *L. littorea*, Iakovleva *et al.* (2006a) ont pu démontrer une activation de la phosphorylation de la MAP Kinase p38 majoritairement, par du LPS ou du PMA (Phorbol Myristate Acetate). Cette voie aurait un rôle dans la transduction de la réponse bactéricide, dans l'induction de la phagocytose et éventuellement par la régulation des sous-unités

cytosoliques de la NADPH oxydase (Humphries & Yoshino 2008). De même, une activation de la phosphorylation de la MAP Kinase p38 est notée dans les hémocytes de moule *Mytilus edulis* suite à des contacts bactériens (Canesi *et al.* 2002a; Canesi *et al.* 2002c; Canesi *et al.* 2005). De plus, l'inhibition de cette voie par des inhibiteurs spécifiques tels que le SB203580 empêche cette phosphorylation, ce qui se traduit par une diminution de la dégradation bactérienne par les hémocytes (Canesi *et al.* 2002a; Canesi *et al.* 2002c).

Chez *B. glabrata*, des composants de la voie de signalisation induite en réponse au PMA et qui aboutit à la régulation de la production du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ont été identifiés, et comptent parmi eux les MAP Kinases, p38 et ERK (Humphries & Yoshino 2008). Une seconde étude a pu lier la voie des MAP Kinase à la phagocytose et à la production d'H₂O₂ chez *B. glabrata* : Zelck *et al.* (2007) ont démontré que la transduction du signal menant à la phagocytose, à l'activation de la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et à l'encapsulation de *Schistosoma mansoni* passait par la voie des MAP Kinases puisque l'utilisation d'inhibiteurs des MAP Kinases limitait ces processus.

L'internalisation fait appel à un mécanisme faisant intervenir des remaniements du cytosquelette, et elle est suivie de la **dégradation intracellulaire** qui s'effectue au sein du phagolysosome, ou compartiment de fusion entre l'endosome ou phagosome et le lysosome. Cette dernière s'effectue par la formation d'EOR et/ou par la libération d'enzymes lysosomales (Bachère *et al.* 1995; Roch 1999; Chu 2000).

La production d'espèces oxygénées réactives (EOR)

Les espèces réactives de l'oxygène regroupent le radical d'oxygène singulet ¹O₂, l'anion superoxyde O₂⁻, le radical hydroxyle OH[·], l'oxyde nitrique NO et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Leur production, ou poussée respiratoire, est couplée à la phagocytose ou fait suite à la stimulation des phagocytes par des produits microbiens (Roch 1999; Tiscar & Mosca 2004). Leur production débute par la réduction par la NADPH oxydase (Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate oxydase) d'une molécule d'oxygène en anion O₂⁻. Celui-ci est alors converti en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la SOD (Superoxyde dismutase), et éventuellement sous la forme de radicaux hydroxyles OH[·] et de singulet de l'oxygène ¹O₂ (Figure 12). Une seule étude relate la présence d'EOR chez les ormeaux *H. rufescens* et *H. cracherodii*, et ce, suite à des stress chimiques (Martello & Tjeerdema 2001).

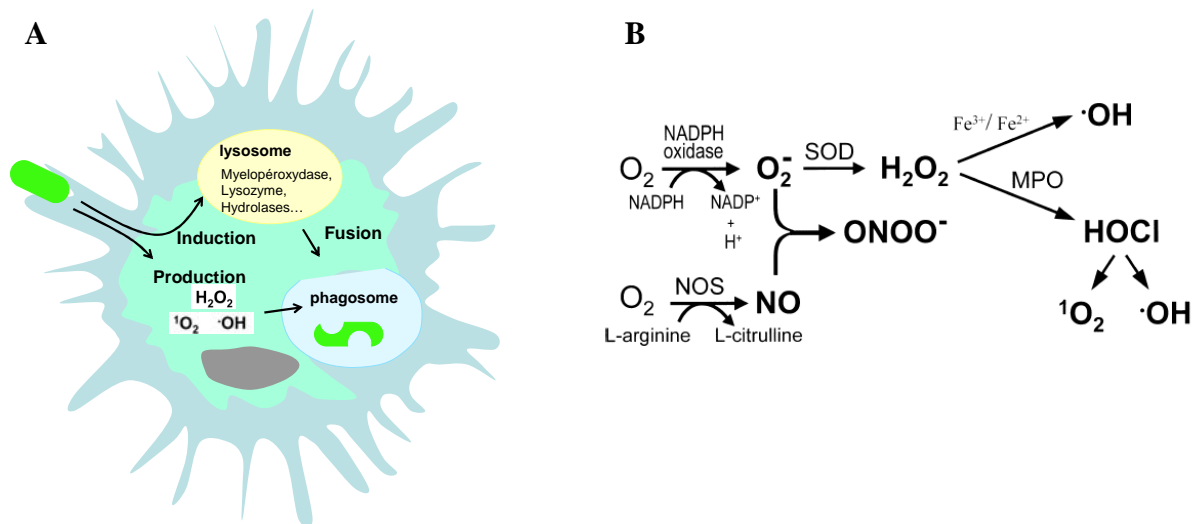


Figure 12 : Processus de dégradation intracellulaire

A. Représentation des processus connus de dégradation intra-cellulaire intervenants après phagocytose par les hémocytes. Les voies dépendantes (production d'EOR) et indépendantes de l'oxygène (induction d'enzymes lysosomales) sont représentées. **B.** Production d'EOR par la voie dépendante de l'oxygène (selon Babior *et al.*, 1999). SOD : Superoxyde Dismutase, NOS : NO Synthase, MPO : Myéloperoxydase.

Ces radicaux sont très instables, très réactifs et hautement microbicides (Babior 1999). Ils sont également toxiques pour les cellules de l'hôte, qui possèdent des systèmes enzymatiques pour s'en protéger, comme les enzymes SOD, peroxydases ou catalases. Ces enzymes ont toutes été isolées très récemment chez l'ormeau japonais (Ekanayake *et al.* 2006; Ekanayake *et al.* 2008; Pushpamali *et al.* 2008).

Une catalase, nommée Ab-catalase, de 501 acides aminés a déjà été isolée chez l'ormeau *H. discus discus* (Ekanayake *et al.* 2008). Cette protéine est constitutivement exprimée dans les branchies, le manteau, la gonade, les hémocytes, le muscle et le tractus digestif. Son expression est également induite par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qu'elle est capable de décomposer.

Des peroxydases (thioredoxine peroxydases AbTPx1 et AbTPx2) ont été isolées chez *H. discus discus* récemment (Pushpamali *et al.* 2008). Exprimées constitutivement au niveau des branchies, du manteau, du muscle et du tractus digestif, ces protéines de 251 et 199 acides aminés sont également induites par un stress oxydatif (par injection intramusculaire de H_2O_2). L'expression de protéines recombinantes dans *E. coli* lui permet de développer une tolérance face à 0,4 mM et 0,8 mM de H_2O_2 .

Enfin, une SOD manganèse dépendante a été clonée chez *H. discus discus* et exprimée chez *E. coli*, ce qui a permis de prouver son implication dans la réaction de conversion de l' O_2^- en H_2O_2 (Ekanayake *et al.* 2006).

Les EOR peuvent également réagir avec d'autres molécules, et former des molécules encore plus toxiques. La myéloperoxydase permet ainsi la dismutation du peroxyde d'hydrogène en hypochlorite (eau de javel). De même, l'oxyde nitrique (NO), produit à partir de l'arginine par la NO synthase (NOS), peut réagir avec l'anion superoxyde et générer du peroxyde nitrite ($ONOO^-$), composé au fort pouvoir microbicide (Ottaviani *et al.* 1993; Conte & Ottaviani 1995) (Figure 12B).

1.3.3 L'immunité humorale

La réponse humorale s'effectue par l'intermédiaire de molécules solubles cytotoxiques produites par les hémocytes (cascade d'activation de la pro-phénoloxidase, enzymes lysosomales, inhibiteurs de protéases, peptides antimicrobiens ou perforines)

Cascade de la pro-phénoloxidase

La phénoloxidase (PO) est une enzyme responsable de la production de mélanine, composant terminal de la cascade de la pro-phénoloxidase. L'activité de cette enzyme est induite en réponse à des bactéries, par un clivage spécifique de la pro-protéine par une serine protéase endogène (Soderhall *et al.* 1994). Sous sa forme active, elle catalyse la conversion de phénols en quinones, qui forment par polymérisation la mélanine, et des composés intermédiaires bactéricides, par exemple l'*o*-quinone. Chez les mollusques bivalves, elle joue un rôle important dans la réponse mise en place face à des pathogènes, et son rôle dans la résistance à des maladies comme la maladie de l'anneau brun a été mis en évidence (Ford & Paillard 2006) (Paillard, données non publiées). Une activité PO a été mise en évidence chez l'ormeau japonais ; cette activité est modulée selon les concentrations en ammonium, nitrates et selon la température (Cheng *et al.* 2004a, b, c, d).

Enzymes lysosomales

Les activités d'enzymes lysosomales (β -glucuronidase, phosphatase acide (ACP) et phosphatase alcaline (ALP), lipase, aminopeptidase, lysozyme) ont été observées chez les mollusques bivalves dans les granules de granulocytes. Leur présence extracellulaire dépend de la dégranulation qui a lieu pendant la phagocytose. Les enzymes lysosomales ont aussi des fonctions digestives, comme l'indique leur présence dans la glande digestive des mollusques (Roch 1999). Chez les ormeaux, des activités d'acide phosphatase, d'alcaline phosphatase et lysozyme ont été mesurées (Martello & Tjeerdema 2001; Shuhong *et al.* 2004). Il est à noter que l'activité lysozyme mesurée chez les ormeaux est très faible en comparaison avec les bivalves, ce que les auteurs lient à la très faible présence de granulocytes synthétisant cette enzyme. Cependant, nous pourrions nous demander si les protocoles expérimentaux étaient adaptés à cette enzyme et/ou si une induction de l'enzyme est nécessaire pour déceler son activité.

Inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases ont différentes fonctions : (1) protéger l'hôte de l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes qui produisent des composés toxiques et (2) lutter contre les pathogènes (Oliver *et al.* 1999; Tall *et al.* 1999). Parmi les inhibiteurs de protéases, les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloprotease) et les serpinines (serine-protease inhibitor) ont été trouvées chez l'huître (Gueguen *et al.* 2003; Montagnani *et al.* 2007; Tirape *et al.* 2007). La Cg-Timp (*Crassostrea gigas* Tissue Inhibitor of Metalloprotease) est transcrite dans les hémocytes en réponse à des injections bactériennes et surtout des injections de produits extracellulaires bactériens (ECP) (Montagnani *et al.* 2007). Par contre, la serpine n'a été identifiée qu'à partir d'une banque d'EST (Expressed Sequence Tag) (Gueguen *et al.* 2003) et sa fonction n'est pas validée. Aucune de ces molécules n'a été, à ce jour, identifiée chez l'ormeau.

Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des effecteurs du système immunitaire les plus largement répandus dans le règne du vivant. Ils présentent une grande diversité structurale et

fonctionnelle. Ils peuvent venir de l'expression de gènes ou de l'hydrolyse de macromolécules aux fonctions différentes. Le plus souvent, ils adoptent une structure de type amphipatique soit en hélice α , en feuillet β ou mixtes, associant une hélice α à un feuillet β , le tout stabilisé par plusieurs ponts disulfures. Leurs structures tridimensionnelles sont particulièrement bien conservées, malgré une grande diversité des séquences primaires.

Chez les mollusques, les peptides anti-microbiens n'ont été trouvés que chez les bivalves, les premiers ayant été révélés chez la moule (Charlet *et al.* 1996; Mitta *et al.* 2000a; Mitta *et al.* 2000b). Quatre groupes de peptides cationiques à pont disulfures ont été mis en évidence : les défensines, les myticines, les mytilines et les mytimicines. Les deux premiers ont une activité antimicrobienne (contre les bactéries à Gram positives), la myticine est antibactérienne et antifongique, alors que la mytimicine est exclusivement antifongique. Chez l'huître, deux peptides présentant des homologues avec des défensines ont été identifiés : AOD (American Oyster Defensin) au spectre d'activité large (Seo *et al.* 2005) et Cg-Def (*C. gigas* Defensin), exprimée dans le manteau avec une action microbicide dirigée contre les bactéries à Gram positif (Gueguen *et al.* 2006).

Le mode de fonctionnement de ces peptides est divers : ils peuvent former des pores dans la membrane ou avoir des cibles intracellulaires (Pour revue Jenssen *et al.* 2006).

Perforine

Les perforines de mammifère sont des protéines cytolytiques et régulatrices des lymphocytes. La perforine de mammifère, Mpeg1 (Macrophage expressed gene 1), est exprimée dans les macrophages matures et dans les cerveaux de souris infectées par le prion. Un homologue de cette protéine a été décrit chez les ormeaux *H. rugata* et *H. rufescens* (Mah *et al.* 2004). C'est la première perforine-like décrite chez les mollusques. La protéine d'ormeau saMpeg1 est, elle aussi, exprimée dans les cellules immunitaires, et surexprimée 8h après un contact avec la bactérie *V. parahaemolyticus* (Wang *et al.* 2008a). Les similarités structurales et les niveaux d'expression après l'infection bactérienne permettent aux auteurs de suggérer que saMpeg1 jouerait un rôle dans la réponse immunitaire anti-bactérienne des ormeaux.

1.3.4 Modulation de l'immunité

Les ormeaux sont des animaux marins poïkilothermes et osmoconformeurs, ce qui implique que les hémocytes sont exposés aux changements thermiques et salins qui ont lieu dans l'environnement. L'immunité cellulaire et humorale des mollusques bivalves peut être modulée par de nombreux facteurs environnementaux (Fisher 1988), mais aussi en fonction de la physiologie et de la génétique des animaux. Très peu d'études ont étudié l'importance de ces facteurs sur l'ormeau.

Température, salinité et variations saisonnières

Dans la littérature, les effets de la température sur l'immunité des invertébrés sont assez variables ; les auteurs travaillent souvent dans des gammes de température variées, des conditions expérimentales diverses, et n'indiquent pas toujours la température optimale des animaux. Il est ainsi difficile d'avoir une vue globale de l'effet de la température sur l'immunité des mollusques. La température semblerait avoir un effet plutôt négatif sur le système immunitaire des mollusques marins, comme tentent de l'illustrer les exemples qui suivent. Une augmentation de température peut induire, chez différents bivalves marins, une diminution de l'activité de phagocytose (Hégaret *et al.* 2003a; Hégaret *et al.* 2003b; Hégaret *et al.* 2004; Chen *et al.* 2007), de la taille des cellules (Hégaret *et al.* 2003a, b; Hégaret *et al.* 2004) de l'activité phosphatase acide (Chen *et al.* 2007) ou une destabilisation des membranes lysosomales (Hauton *et al.* 1998, 2001).

A l'inverse, l'effet d'une augmentation de la température (14°C vs 21°C) sur les paramètres hémocytaires chez la palourde *Ruditapes philippinarum* est plutôt bénéfique, puisqu'elles présentent une augmentation du nombre d'hémocytes circulants et viables, et de l'activité leucine-amino peptidase. Il faut ajouter que les auteurs ont noté à 21°C une plus faible prévalence de maladie de l'anneau brun (Paillard *et al.* 2004a).

Chez l'ormeau *H. diversicolor supertexta*, une température de 28°C induit une diminution de l'activité de phagocytose et de l'activité phénoloxydase des hémocytes, et augmente leur production basale d'EOR (Cheng *et al.* 2004c). La stabilité des membranes lysosomales est, chez *H. rubra*, fortement diminuée suite à des chocs de températures, ou pour des températures non comprises entre 15 et 17°C, qui semblent être les températures optimales pour la stabilité membranaire des hémocytes d'ormeau (Wang *et al.* 2006).

Les ormeaux peuvent également être exposés à des fortes variations de salinité, ce qui se traduit par une diminution de l'activité de phagocytose chez l'ormeau rouge *H. rufescens* (Martello *et al.* 2000), par une diminution de l'activité phénoloxydase, de la production d'EOR et de l'activité de phagocytose chez *H. diversicolor supertexta* (Cheng *et al.* 2004d).

Dans le milieu naturel, des variations dites saisonnières des paramètres hémoctaires (à lier à la température, à la salinité ou à d'autres paramètres influençant l'immunité) ont été notées sur des populations de palourdes suivies *in situ* dans le lagon de Venise (Matozzo *et al.* 2003) ou dans le Golfe du Morbihan (Soudant *et al.* 2004). La prise en compte des paramètres physiologiques des animaux (reproduction et alimentation) est essentielle pour proposer une explication à ces variations.

Reproduction et Alimentation

Les paramètres immunitaires des mollusques peuvent être modulés par l'état de reproduction des animaux. Une diminution de l'activité de phagocytose, au moment de l'effort de reproduction, a été démontrée chez *C. gigas* lors d'un cycle de reproduction expérimental (Delaporte *et al.* 2006a) et en comparant des huîtres diploïdes à leurs homologues triploïdes, considérés comme des animaux stériles (Gagnaire *et al.* 2006).

La qualité de l'alimentation joue également un rôle et certains acides gras comme le 20:5(n-3) et 20:4(n-6) semblent particulièrement importants pour la réponse immunitaire cellulaire (Delaporte *et al.* 2003; Delaporte *et al.* 2006b). Enfin, une limitation en alimentation a un impact très marqué : elle se traduit par une maturation des gonades limitée et par une diminution du taux d'hémocytes circulants. Ainsi, alimentation et effort de reproduction sont liés, et affectent tous deux l'immunité des huîtres. Cependant, même si un lien avec la sensibilité aux pathogènes a été suggéré (Delaporte *et al.* 2006a), la relation directe reproduction / immunité / sensibilité aux pathogènes n'a toujours pas été démontrée.

Présence d'un pathogène

Les études de suivi des paramètres immunitaires réalisées suite à des infections expérimentales ont permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration en

hémocytes circulants chez la palourde et chez l'huître (Ford *et al.* 1993; Oubella *et al.* 1993; Allam *et al.* 2000; Allam *et al.* 2001). Oubella *et al.* (1993) interprètent cette augmentation comme une mobilisation des hémocytes vers le site d'infection.

Suite à son injection dans la cavité palléale, *Vibrio tapetis* entraîne ainsi chez *R. philippinarum* une augmentation du taux d'hémocytes circulants, mais également une augmentation de l'activité leucine-amino peptidase dans les 72h, puis une chute de ces mêmes paramètres (Oubella *et al.* 1993; Oubella *et al.* 1994). Cette dépression immunitaire, dans les dernières phases de l'infection, pourrait être une conséquence du stress physiologique associé à un effet du pathogène. Ces effets n'ont pas été retrouvés quand les bactéries sont tuées par la chaleur, preuve de l'influence des paramètres bactériens sur l'induction sélective des mécanismes de défense (Oubella *et al.* 1996).

D'autres pathogènes ont aussi la capacité de moduler les paramètres immunitaires, comme *Marteilia sydneyi* qui supprime l'activité phénoloxydase chez l'huître (Peters & Raftospeters 2003; Bezemer *et al.* 2006), ou *V. alginolyticus* qui entraîne le même effet chez la crevette *Penaeus vannamei* (Hsieh *et al.* 2008). C'est le cas également de *Perkinsus atlanticus* qui touche la phagocytose de la palourde *R. philippinarum* (Ordas *et al.* 1999; Ordas *et al.* 2000).

Les pathogènes affectent aussi la stabilité membranaire des hémocytes, comme Hauton et ses collaborateurs (2000; 2001) l'ont montré pour les huîtres *Ostrea edulis* et *C. gigas*, en présence de *Listonella anguillarum*.

Bonamia ostreae induit, chez *O. edulis*, d'une part, une diminution de l'activité phénoloxydase, du taux d'hémocytes circulants et plus particulièrement des granulocytes (Cochennec-Laureau *et al.* 2003; da Silva *et al.* 2008), et d'autre part, un élargissement de la membrane du phagosome et la formation d'une vacuole parasitaire à l'intérieur des hémocytes, ce qui lui permet de survivre et de se diviser. Sa capacité à limiter la fusion lysosome-phagosome pendant la phagocytose est suspectée (Hine & Wesney 1994), mais n'est toujours pas démontrée.

L'utilisation de méthodes plus globales telles que les analyses génomiques et les banques soustractives ont permis d'améliorer les connaissances moléculaires du système immunitaire des mollusques marins. C'est par ces méthodes que la voie NF- κ B a été décrite chez l'ormeau japonais (Wang *et al.* 2008b), et que, chez les mollusques bivalves, des peptides antimicrobiens, des éléments de la voie du complément, des récepteurs de la voie

Toll-like et des protéines impliquées dans la protection aux EOR, ont été découverts (Huvet *et al.* 2004; Tanguy *et al.* 2004; Gestal *et al.* 2007; Prado-Alvarez *et al.* 2008).

Cependant, ces études qui visaient à comparer des organismes infectés/ non infectés ou sensibles/résistants, n'ont mis en évidence que peu de régulations transcriptionnelles des gènes impliqués dans l'immunité. En effet, la part de gènes identifiés impliqués dans l'immunité ne représente souvent que 3 à 20 %. Ceci peut avoir plusieurs explications : d'abord, il est possible que ces gènes n'aient simplement pas pu être annotés de par le très peu d'informations génétiques sur les mollusques, que les fragments révélés par les banques soient des séquences d'ARNm non traduites (et peu conservées) donc non disponibles dans les banques protéiques ou que les niveaux d'expression de gènes soient très bas donc plus difficilement analysables par une banque soustractive.

Stress physique

Malham *et al.* (2003) ont étudié l'effet d'un stress mécanique, assimilé aux stress induits par les techniques d'aquaculture chez *H. tuberculata*. Les effets observés sont transitoires, mais une diminution marquée du nombre d'hémocytes, de leur capacité de migration et de leur capacité de phagocytose a pu être notée.

Génétique

Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée sur les ormeaux, nous ne pouvons ignorer l'existence de différences immunitaires selon les origines génétiques des animaux.

En effet, des différences de sensibilité ont tout d'abord été montrées chez des populations sélectionnées d'huîtres *C. virginica*, résistantes au parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX) (Ford 1986; Ford & Haskin 1987). Cette propriété de résistance au MSX a ensuite été retrouvée dans des populations ne présentant aucune mortalité et ayant des taux plus élevés d'hémocytes circulants et de lysozyme (Chu & La Peyre 1993).

Chez la palourde *R. philippinarum*, des différences de composition et d'activités hémocytaires ont été démontrées entre des souches américaines et françaises de palourdes. Les palourdes américaines, moins sensibles au pathogène *V. tapetis*, présentaient des taux de phagocytose et un pourcentage de granulocytes plus élevé (Allam *et al.* 2001). Un suivi individuel de palourdes a montré que celles ayant un taux d'hémocytes circulants et une

activité phénoloxydase supérieurs avant infection, présentaient également une meilleure survie suite à l'injection intra-palléale de *V. tapetis* (Paillard, données non publiées). Un programme de sélection de familles de palourdes présentant des capacités de résistance à la maladie de l'anneau de brun a ainsi été entamé.

Des familles d'huîtres *Saccostrea glomerata*, sélectionnées comme résistantes à *Marteilia sydneyi*, ont une activité phénoloxydase (PO) plus élevée, et une isoforme particulière visualisée en électrophorèse native (Newton *et al.* 2004). Cinq isoformes de PO ont finalement été identifiées dans des huîtres du milieu naturel et dans les huîtres sélectionnées (la 4^e génération). Une de ces isoformes, PO^b, est moins fréquente chez les résistants que dans le milieu naturel et sa fréquence dans les populations naturelles diminue au cours de mortalités associées à *M. sydneyi* (Bezemer *et al.* 2006).

Très récemment, dans le cadre du programme MOREST (MORTalité ESTivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*), des familles génétiques ont été sélectionnées pour leur résistance aux mortalités estivales. Les familles dites résistantes présentaient un taux d'hémocytes circulant supérieur et leur production de ROS était moins affectée par *Vibrio aesturianus* que les familles sensibles (Lambert *et al.* 2007).

Et enfin, chez l'huître plate, Hawkins *et al.* (Hawkins *et al.* 1993) ont montré des différences entre des populations d'Angleterre, du Pays de Galles ou d'Ecosse, en terme de production d'EOR et de taux d'hémocytes circulants. Les auteurs suggèrent que la meilleure tolérance à *B. ostreae* de la population écossaise serait liée à sa meilleure capacité immunitaire. Différents plusieurs programmes de sélection génétique ont également été menés en France et en Hollande, et une comparaison des populations naturelles résistantes et des familles d'*O. edulis* présentaient à la fois des différences de sensibilité au parasite *B. ostreae* et des capacités immunitaires différentes : les familles les plus sensibles avaient le moins d'hémocytes et de granulocytes (da Silva *et al.* 2008).

1.3.5 Mémoire immunitaire ?

Il est admis par la communauté scientifique que les réactions immunitaires des invertébrés sont du ressort de la seule immunité innée. Pourtant depuis quelques années, de plus en plus de travaux concluent à l'existence d'une « mémoire spécifique » chez des invertébrés (Pour revue Rowley & Powell 2007) (Figure 13). En particulier, le développement de vaccins efficaces chez la crevette, limitant sa sensibilité au virus WSSV (White Spot

Syndrome Virus) (Witteveldt *et al.* 2006; Rajesh Kumar *et al.* 2008) et à *V. harveyi* (Alabi *et al.* 1999) remet ce dogme en question.

Ce dogme reposait sur le fait que le système immunitaire des invertébrés n'a pas de lymphocytes antigènes spécifiques et d'immunoglobulines (Ig) fonctionnels, à la base de l'immunité adaptative chez les vertébrés. Cependant, Cooper et Roch (1986) ont montré que des vers de terre pouvaient reconnaître et rejeter des greffes venant d'autres vers de terre, et ce, de façon encore plus rapide lors d'une 2^o exposition. Mais la base mécanistique de cette reconnaissance du soi et du non-soi reste encore floue.

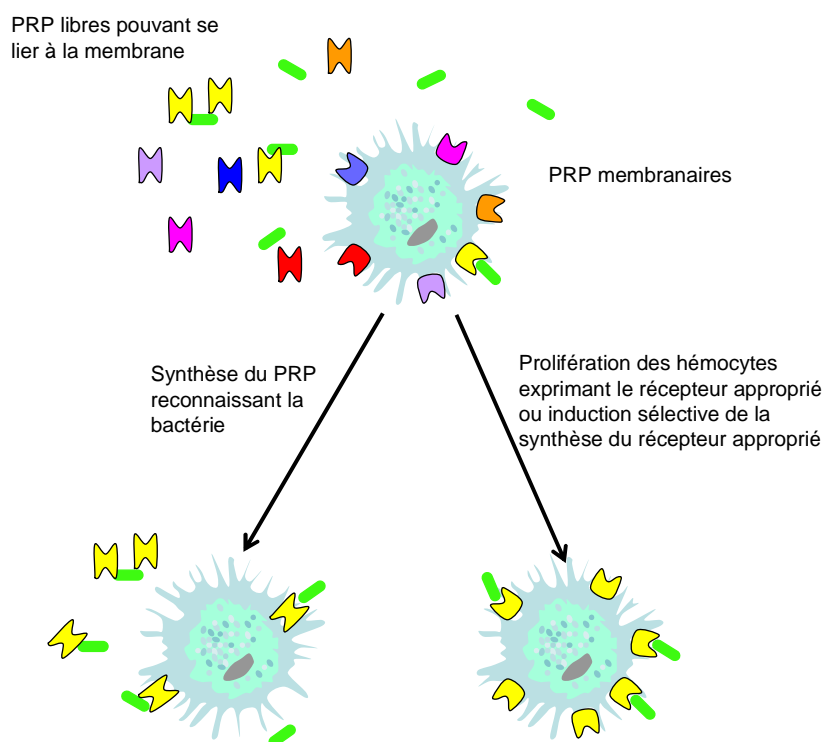


Figure 13 : Explication mécanistique de la réponse immunitaire spécifique (selon Rowley *et al.*, 2007)

La présence de PRPs (Pathogen Recognition Pattern) libres ou membranaires, qui pourraient se lier spécifiquement à des molécules bactériennes ou virales, permet de proposer une explication à l'induction de la dégradation des agents microbiens, observée lors d'une seconde infection.

Les premiers récepteurs permettant la reconnaissance du soi ont été identifiés très récemment chez l'ascidie *Botryllus schlosseri* (Nyholm *et al.* 2006). La diversité somatique de ce récepteur, appelé Fester, repose sur des épissages alternatifs, résultant en des formes individuelles spécifiques de ce récepteur.

De plus, des protéines de la super famille des immunoglobulines ont été trouvées chez la drosophile (Watson *et al.* 2005) et chez le moustique *Anopheles gambiae* (Dong *et al.* 2006) : les Dscam (Down syndrome cell adhesion molecule). Les isoformes que ces molécules pourraient former suite à des épissages alternatifs seraient au nombre de 18 000 et 31 000 respectivement. Chez *A. gambiae*, des mises en contact d'hémocytes avec différentes bactéries Gram positives ou négatives, ou des parasites du genre *Plasmodium berghei* et *P. falciparum* induisent rapidement différentes formes d'épissage des AgDscam. Des expériences *in vivo* révèlent également qu'après exposition aux deux parasites, différentes formes d'épissage sont retrouvées. Par la technique des RNAi dirigés contre les AgDscam, Dong *et al.* (2006) montrent une claire défaillance du système immunitaire des moustiques qui deviennent sensibles à des bactéries opportunistes. Ces expériences montrent de façon convaincante que la nature du pathogène utilisé pour le challenge se traduit par des variants d'épissage des Dscam.

D'autres molécules, les FREPs (Fibrinogen-Related Proteins) ont été isolées chez le gastéropode *B. glabrata*. Elles consistent en plusieurs domaines de la superfamille des IgSF, associés à un domaine fibrinogène en C terminal. Ces molécules sont produites par les hémocytes après des infections parasitaires, et sont capables de précipiter des antigènes solubles. Une hypervariabilité génétique est observée au niveau de ces gènes (314 séquences différentes pour 22 vers étudiés) et serait à la base d'une diversification des molécules reconnaissant le non-soi (Zhang *et al.* 2004).

Une réponse immunitaire basée sur des récepteurs spécifiques à un pathogène est ainsi envisageable, et expliquerait la spécificité de réponse immunitaire qui a été relatée par Sadd et Schmid-Hempel (2006). Ils ont travaillé sur des bourdons *Bombus terrestris* initialement exposés à une bactérie à Gram négative *Pseudomonas fluorescens*, à deux bactéries à Gram positives, *Paenibacillus alvei* et *P. larvae*, ou à une solution saline. Huit ou vingt-deux jours après, les insectes ont subi une deuxième infection homologue ou hétérologue, et leur survie et capacité à éliminer les bactéries de leur sang a été étudiée. Dans le groupe de ré-exposition homologue, des taux de survie significativement plus élevés ont été notés (par rapport aux groupes exposés de façon hétérologue, ou avec la solution saline, aux jours 8 et 22). Ils n'ont cependant pas noté de différences dans la production des peptides antimicrobiens, et proposent (mais ne montrent pas) que la spécificité serait liée aux cellules immunitaires, par l'expression de Dscam spécifiques par exemple.

1.3.6 Conclusion générale sur l'immunité

Il y a ainsi de plus en plus d'éléments permettant de supposer que certains invertébrés auraient de hauts niveaux de spécificité dans leur réponse immunitaire, selon les pathogènes. Mais les bases moléculaires de ces observations sont encore restreintes, certainement du fait que les recherches se basent sur la comparaison avec le système des vertébrés (Rowley & Powell 2007). Ce sont certainement les études génomiques, qui nous ont déjà appris beaucoup sur l'immunité des invertébrés (Gueguen *et al.* 2003; Tanguy *et al.* 2004; Gestal *et al.* 2007), qui apporteront dans le futur, les preuves moléculaires de l'existence d'une immunité spécifique (et peut-être adaptative ?).

1.4. Les maladies des ormeaux

Avant d'énumérer les différents pathogènes métazoaires, protozoaires, viraux ou bactériens, qui peuvent affecter les ormeaux, il est important de rappeler que la présence seule d'un pathogène et de son hôte n'est pas suffisante au développement d'une maladie. L'environnement conditionne ce développement. Nous nous attacherons donc dans cette partie à décrire les pathogènes d'ormeaux, et les conditions dans lesquelles les maladies auxquelles ils sont associés (quand elles sont connues) peuvent se développer.

1.4.1 Maladies associées à des agents métazoaires

Les nématodes (métazoaires pseudo-coelomate, embranchement Némathelminthes) du genre *Echinocephalus pseudouncinatus* ont été identifiés chez les ormeaux *H. corrugata* et *H. fulgens*, aux USA et au Mexique. Ils sont retrouvés principalement dans le muscle des ormeaux, ce qui diminue leur force musculaire. Les ormeaux, comme les oursins, sont des hôtes intermédiaires pour ces parasites, dont les hôtes définitifs sont le requin dormeur cornu *Heterodontus francisci* ou la raie *Myliobatis californicus* (Bower 2001).

Des trématodes métacercaires (métazoaires métatriploblastiques, embranchement Plathelminthes) ont été retrouvés chez *H. ruber*, *H. roci* et *H. spadicea* en Australie et en Afrique du Sud. Dans tous les cas, le développement des trématodes n'est pas complet (seuls les premiers stades de développement sont observés chez les ormeaux), ce qui a limité leur

identification. La prévalence et l'intensité d'infection sont faibles et ils ne causent que peu de dégâts aux ormeaux, entraînant dans les cas extrêmes la stérilité de ceux-ci (Bower 2001).

De nombreux polychètes perforants, créant de gros dommages au niveau de la coquille des ormeaux, ont été isolés depuis les années 1980 (Oakes & Fields 1996). Nous pourrions citer des polychètes du genre *Polydora* spp. (*P. ricketssi*, *P. limicola*, *P. uncinata* (Figure 14A-C) et *P. websteri*), *Dipolydora armata* et *D. huelma*, *Boccardia knoxi*, *Dodecaceria opulens*, ou *Terebrasabella heteroucinata*. Ils touchent la plupart des ormeaux (Figure 14D), et cette « peste de l'ormeau » a été récemment introduite au Chili suite à des transferts d'animaux à partir du Japon (Oakes & Fields 1996; Bower 2001; Radashevsky & Olivares 2005).

En réponse à l'infection du ver qui s'installe entre la coquille et le manteau, l'ormeau forme une couche de nacre pour emprisonner le parasite. *T. heteroucinata* entraîne ainsi un ralentissement de la croissance et une déformation de la coquille des juvéniles, en contrôlant, au moins en partie la synthèse coquillière (Day *et al.* 2000).

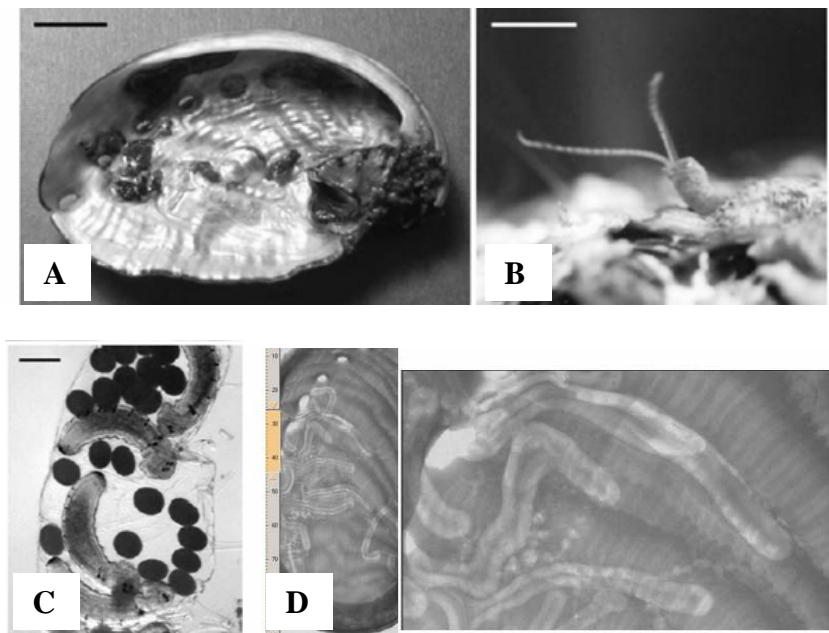


Figure 14 : Polychètes perforants

(A-C) *Polydora uncinata* (selon Radashevsky *et al.*, 2005) (A) Surface interne d'une coquille d'ormeau sévèrement infecté. Barre = 10 mm (B) Face extérieure de la coquille montrant un ver sortant de son tube. Barre = 5 mm (E) Œufs et larves en développement Barre = 100 μ m. (D) Radiographie de coquille d'*H. tuberculata* réalisée par M. Koken et la société Animage.

Un lien entre la présence de ces polychètes et la formation d'un dépôt de chonchioline brun parfois observé sur la coquille des ormeaux a été suggéré (Huchette *et al.* 2006). De nouvelles techniques et traitements, comme une mise à sec des animaux, permettraient de limiter les problèmes liés aux polychètes (Lleonart *et al.* 2003).

1.4.2 Maladies associées à des agents protozoaires

Labyrinthuloides haliotidis (Protozoa : Mycetozoa : Labyrinthulida) est un pathogène des juvéniles d'ormeaux *H. kamtschatkana* and *H. rufescens* ayant causé au Canada jusqu'à 100% de mortalité chez les juvéniles (Bower 1987; Bower *et al.* 1989).



Figure 15 : *Labyrinthuloide haliotidis* (selon Bower, 2005)

(A) Zoosporoblaste, (B) Zoospore biflagellée, (C) Coupe histologique colorée à l'hématoxyline-éosine montrant la présence de labyrinthus (flèches).

Le stade végétatif de *L. haliotidis* peut se développer quand celui-ci est placé dans l'eau de mer, par des multiples fissions produisant un zoosporoblaste (Figure 15A). Celui-ci contient une dizaine de zoospores biflagellées (Figure 15B), qui s'échappent par rupture de l'enveloppe. Ces cellules peuvent nager 24 heures avant de perdre leur flagelle, et peuvent résister ainsi (sous forme pseudo-végétative) dans de l'eau de mer à 5°C pendant deux ans. Les stades végétatifs et zoospores sont les stades infectieux pour les juvéniles. Vingt-quatre heures après infection, le parasite infecte les tissus de la tête et du muscle (Figure 15C), et des divisions peuvent être observées (Bower *et al.* 1989). *L. haliotidis* se multiplie rapidement dans l'hôte et après 10 jours de contact avec 10^4 parasites, près de 90% des ormeaux meurent (< 4 mm et âgés de 140 jours). La prévalence et l'intensité d'infection diminuent au fur et à mesure que l'ormeau grandit. Les ormeaux de taille supérieure à 15 mm ne peuvent plus être infectés, même suite à des injections intramusculaires.

L'impact de *L. haliotidis* sur des ormeaux du milieu naturel et la répartition géographique de ce parasite sont inconnus, surtout à cause de la taille des ormeaux sensibles, trop petits pour être trouvés dans le milieu (Bower 2005).

Différents ciliés (Protozoa : Alveolata : Ciliophora) ont pu être isolés d'ormeau, en Afrique du Sud, en Californie, au Mexique, au Canada et plus récemment en Chine : *Mantoscyphidia* sp., *Scyphidia*-like, *Sphenophrya*-like et *Epicarchesium abrae* (Bower 2001; Ji *et al.* 2004). Ils infectent de nombreuses espèces d'ormeau dont *H. midae*, *H. iris*, *H. spadicea*, *H. kamtschatkana*, *H. rufescens*. Ils s'attachent à l'épithélium des branchies, du manteau ou des poches oesophagiennes, mais ne semblent pas pénétrer les tissus. Caceres-Martinez *et al.* (2001) aux vues des prévalences et concentrations quasi-identiques trouvées dans les poches oesophagiennes d'ormeaux sains et moribonds, proposent d'ailleurs l'idée d'une symbiose commensale.

Des flagellés du genre *Cryptobia abalonesis* ont pu être identifiés dans l'hémolymphe de l'ormeau *H. diversicolor* en Chine (Chen *et al.* 2004). Ils étaient présents chez tous les ormeaux testés, mais les auteurs ne rapportent aucune mortalité associée.

Les parasites protozoaires du **genre *Haplosporidium*** (Protozoa : Rhizaria : Haplosporidia) sont rencontrés dans des environnements marins et d'eau douce. De nombreuses espèces sont pathogènes de mollusques marins. Par exemple, *Haplosporidium nelsoni* est l'agent pathogène responsable de la maladie infectieuse MSX (Multinucleated sphere unknown) ou dermo qui touche les huîtres *C. virginica* et *C. gigas*. Ce parasite a dévasté les populations naturelles de la côte nord-est des USA et a stoppé l'aquaculture de la région jusque dans les années 1990 (Ford 1985; Burresson & Ford 2004).

Dans les dernières années, de nouveaux cas de mortalités associés à des *Haplosporidium* ont été relatés. Des ormeaux *H. tuberculata* provenant d'élevage en Espagne (Azevedo *et al.* 2006a; Azevedo *et al.* 2008) et des ormeaux néo-zélandais *H. iris* (Diggles *et al.* 2002; Hine *et al.* 2002) ont été touchés par deux nouveaux parasites du genre *Haplosporidium* (*Haplosporidium montforti* et *Haplosporidium* sp.).

Ces parasites obligatoires ont causé, en Nouvelle-Zélande, jusqu'à 90% de mortalités, en 6 mois, dans les bassins infectés. Les ormeaux infectés apparaissaient léthargiques, sans réflexes, et même si certains oedèmes ont pu être observés au niveau du manteau ou du muscle de certains animaux, aucun signe macroscopique sérieux n'a pu être décrit. Les

premiers stades d'infections sont caractérisés par de faible prévalence dans les tissus conjonctifs digestifs, au niveau du manteau et des branchies. Les stades les plus avancés présentent de fortes concentrations en plasmodia de petites tailles dans la plupart des tissus (hémolymphe, branchies, cœur, rein, manteau, pied, épipodium, tissus conjonctifs de la glande digestive) (Diggles *et al.* 2002).

Toutefois, les expériences de cohabitation ou d'injection (injection d'hémolymphe d'animaux infectés) de ce pathogène non cultivable, menées à 14°C et 19°C n'ont pas permis d'observer un développement des parasites dans les trois mois qui ont suivi. Les auteurs expliquent ces résultats par (1) une phase d'incubation potentiellement supérieure à 3 mois, ou (2) le besoin d'une température plus élevée pour le développement de la maladie ou enfin (3) le besoin d'un hôte intermédiaire (Diggles *et al.* 2002).

En Espagne, suite à l'importation d'ormeaux irlandais, *H. montforti* a été isolé dans le cadre de très fortes mortalités (100% de mortalités) (Figure 16). Les signes de la maladie étaient une coloration foncée du pied, une perte d'adhérence et une faible réactivité des animaux. Les tissus infectés étaient, eux aussi, similaires à ceux décrits pour les ormeaux néo-zélandais. Il faut noter que les ormeaux étaient également porteurs de bactéries du genre rickettsie, pouvant être la cause des mortalités. Les auteurs suggèrent, aux vues de la faible prévalence en rickettsies, que *H. montforti*, très fortement présent au sein des tissus, serait l'agent responsable des décès, mais aucune étude de transmission d'*H. montforti* n'a été pour l'instant réalisée. Les conditions d'infections sont donc encore inconnues.

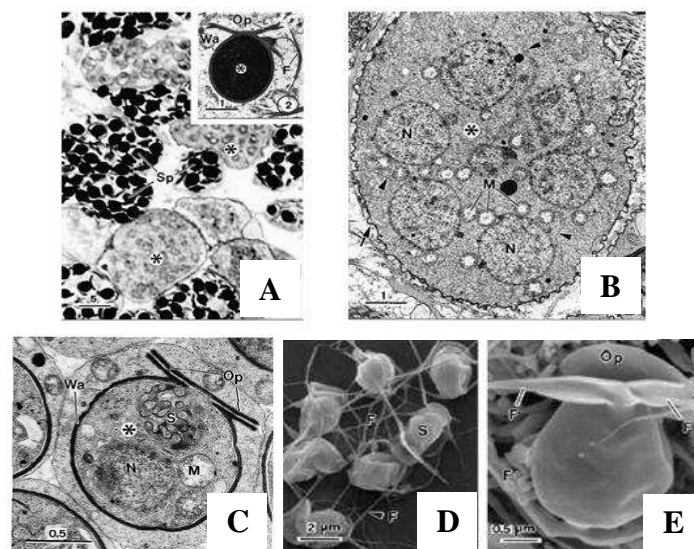


Figure 16 : *Haplosporidium montforti* (selon Azevedo *et al.*, 2006 2008)

Observations d'*H. montforti* dans les tissus d'*H. tuberculata* en microscopie électronique. A-C Microscopie électronique à transmission, A. Spores, B. Plasmodium, C. Spore mature D-E, Microscopie électronique à balayage de spores.

Les infections multiples haplosporidium / rickettsie (dans le même hôte) ont été relatées à deux reprises : dans le cas des ormeaux espagnols (WS-RLP, voir paragraphe 1.4.3, p 60), mais aussi dans le cas des ormeaux néo-zélandais (Hine *et al.* 2002; Balseiro *et al.* 2006).

Le cycle de vie des parasites du genre *Haplosporidium* n'est pas connu, mais une description des différents stades observés au sein d'un seul hôte laisse penser à une auto-infection. Des spores (1-2 µm) peuvent être observés dans les tissus connectifs des ormeaux (Figure 16). Ceux-ci peuvent s'enkyster et après multiplication du noyau, former des plasmodia (Figure 16B). Le plasmodium se vacuolise et devient sporocyste qui peut contenir jusqu'à 100 à 120 sporoblastes qui deviendront des spores après maturation (Azevedo *et al.* 2008) (Figure 16C).

Perkinsus olseni est un protozoaire (Protozoa : Alveolata : Perkinsea) touchant les ormeaux *H. rubra*, *H. laevigata*, *H. cyclobates* et *H. scalaris*. Les premières mortalités associées, dans le milieu naturel, ont touché *H. laevigata* en Australie dans les années 1980, et ont entraîné la perte de 30 à 40% des ormeaux de 3-4 cm. Ces mortalités faisaient suite à l'introduction sur site d'*H. rubra* ; celui-ci était porteur de *P. olseni* qui ne serait cependant pas létal pour cette espèce (Lester & Hayward 2007). *P. olseni* est également suspecté d'avoir causé les fortes mortalités qui ont dévasté les stocks naturels d'*H. laevigata* dans le Golf de Saint Laurent (Canada) et dans le sud de l'Australie. Le transfert d'adultes d'*H. laevigata* dans cette dernière zone, huit mois après les mortalités (à des fins de repeuplement), s'est aussi traduit par de fortes mortalités. Les individus survivants présentaient de très fortes charges en *P. olseni*. Les animaux transférés selon le même protocole un an plus tard n'ont subi aucune mortalité anormale dans les 3 années suivantes, laissant penser à une transplantation réussie (Goggin & Lester 1995). *P. olseni* est peu sélectif pour son hôte : les souches isolées d'*H. laevigata* peuvent également infecter *H. cyclobates*, *H. scalaris* ou plusieurs espèces de bivalves comme les palourdes *R. decussatus* et *R. philippinarum*. Des épisodes de mortalités ont également été signalés en élevage, en novembre 1990 (*H. laevigata*, 30-40 mm, 30% de mortalité) et en 1991 (*H. laevigata*, 30-40 mm, 40% de mortalité) (Goggin & Lester 1995).

Perkinsus prolifère dans les tissus, ce qui peut induire des pustules (abcès marron mesurant jusqu'à 8 mm de diamètre, Figure 17A) dans le pied et le manteau des ormeaux. Trois stades de vie sont décrits chez *Perkinsus* : deux à l'intérieur de l'hôte (trophozoïte et

hypnospore) et un extérieur (zoospore). La forme trophozoïte réside et prolifère par multiplication végétative dans les tissus de son hôte, pour donner naissance au schizon contenant 8 à 32 hypnospores. Les hypnospores (50-100 µm) sont rarement trouvées dans les tissus de l'hôte, mais peuvent être induites par la technique de culture en milieu thioglycollate (FTM) (Figure 17B). Les hypnospores peuvent former, après 9 jours à 20°C ou 3 jours à 28°C, plusieurs centaines de zoospores biflagellés (3-5 µm), les formes infectives pour les ormeaux (Goggin *et al.* 1989).

Des études sur *H. rubra* ont montré une corrélation positive entre l'infection à *P. olseni* dans le milieu naturel, et la température de l'eau, ainsi qu'avec la taille des animaux. De façon similaire, une étude rapporte une limitation de la transmission et une réduction de la sévérité de l'infection par *P. olseni* dans les populations naturelles de *H. rubra* en 2002, année particulièrement froide en Australie (3 °C de moins) (Hayward *et al.* 2006).

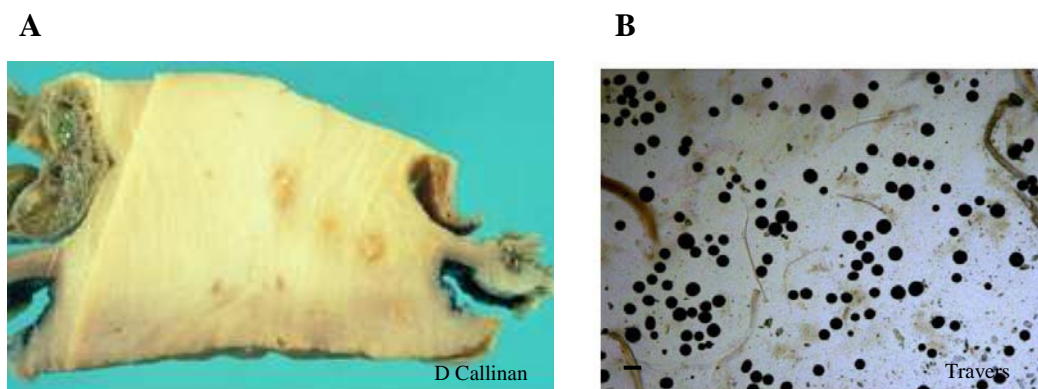


Figure 17 : *Perkinsus olseni*

(A) Abcès dans le pied de l'ormeau vert, Photo D Callinan (B) hypnospores, après culture de tissu d'ormeaux en FTM. Barre = 100 µm

Des coccidi (Alveolata : Apicomplexa) nommés *Margolisiella* (= *Pseudoklossia*) *haliotis* ont pu être trouvés chez *H. corrugata*, *H. cracherodii*, *H. fulgens*, *H. kamschatkana*, *H. rufescens*, *H. walallensis*, *H. midae* et *H. iris* (Friedman *et al.* 1995; Mouton 2000; Bower 2001).

Dans les années 1980-90, ce parasite a été tout d'abord impliqué dans le "Withering Syndrome" (WS), maladie touchant les ormeaux californiens. Mais il est maintenant admis que cette maladie est causée par une bactérie du genre rickettsie (qui sera détaillée plus bas paragraphe 1.4.3, p 60), et que *M. haliotis* est bénin pour les ormeaux.

Ces parasites infectent les cellules épithéliales du rein, qui devient hypertrophié. *M. haliotis* n'entraîne pas d'infiltration hémocytaire, ce qui laisse supposer qu'il n'est pas reconnu par le système immunitaire (Friedman *et al.* 1995). Son cycle de vie est entièrement réalisé au sein d'un seul hôte, mais il se transmet en exposant des animaux à l'eau préalablement occupée par des animaux infectés.

1.4.3 Maladies bactériennes

Candidatus Xenohaliothis californiensis (ou WS-RLP, Withering Syndrome - Rickettsia Like Prokaryote) appartient à la famille des **rickettsies**, qui sont des bactéries intracellulaires Gram-négative. Le préfixe '*Candidatus*' indique un statut taxonomique provisoire, puisque, même si l'espèce a été largement décrite morphologiquement et génétiquement, il manque (de part sa non-cultivabilité) une description biochimique et sérologique.

Cette bactérie est l'agent pathogène responsable du WS, une maladie infectieuse ayant causé de sévères mortalités dans les stocks naturels et cultivés d'ormeaux californiens depuis le milieu des années 1980 (Friedman *et al.* 2000). Elle a entraîné le déclin des populations naturelles de l'ormeau noir (*H. cracherodii*) de plus de 99%. Cette espèce est actuellement inscrite sur la liste des espèces en voie de disparition (Gruenthal & Burton 2008). Des infections à WS-RLP ont été observées chez *H. corrugata*, *H. rufescens*, *H. cracherodii*, *H. fulgens*, *H. sorenseni*, et *H. tuberculata* (Antonio *et al.* 2000; Moore *et al.* 2001b; Hine *et al.* 2002; Braid *et al.* 2005; Azevedo *et al.* 2006b; Balseiro *et al.* 2006) et peuvent être induites en laboratoire chez *H. walallensis* et *H. discus* (Friedman, données non publiées, http://oie.int/eng/normes/fmanual/a_00044.html).

Les signes macroscopiques de la maladie sont similaires à ceux d'un jeûne sévère : léthargie, perte de masse musculaire et mort (Figure 18A). Microscopiquement, les fibres musculaires sont atrophiées et remplacées par des tissus connectifs. Les ormeaux infectés mangent moins (Moore *et al.* 2001b) et l'espace occupé par les cellules impliquées dans l'absorption, la digestion des aliments diminue, ce qui limiterait les fonctions digestives et contribuerait à la mort. Le pathogène forme ainsi de larges inclusions ovoïdes (17 x 55 µm) dans les cellules épithéliales de la portion postérieure de l'œsophage, de la glande digestive, et moins fréquemment, de l'intestin (Figure 18B).

Des températures élevées favorisent la progression de la maladie et augmentent les mortalités. Des ormeaux rouges, *H. rufescens*, infectés par WS-RLP et maintenus à 14,7°C pendant 220 jours ne présentaient pas de signes de WS, contrairement à ceux maintenus à 18,5°C, qui présentaient 33% de mortalités (Moore *et al.* 2001a; Braid *et al.* 2005).

Des traitements antibiotiques ont été développés pour lutter contre ce pathogène, et l'oxytétracycline (OTC) s'est révélée particulièrement efficace (Rosenblum *et al.* 2008). Les auteurs ont testé l'effet d'OTC (103 mg/kg) administré dans de la nourriture artificielle, pendant 10, 20 ou 30 jours. Ils montrent dans tous les cas, une réduction significative de la prévalence, de l'atrophie musculaire et des mortalités associées à WS-RLP. Enfin, les essais de ré-infection réalisés jusqu'à 88 jours après administration de l'OTC montrent que l'antibiotique confère une résistance au pathogène pendant cette durée.

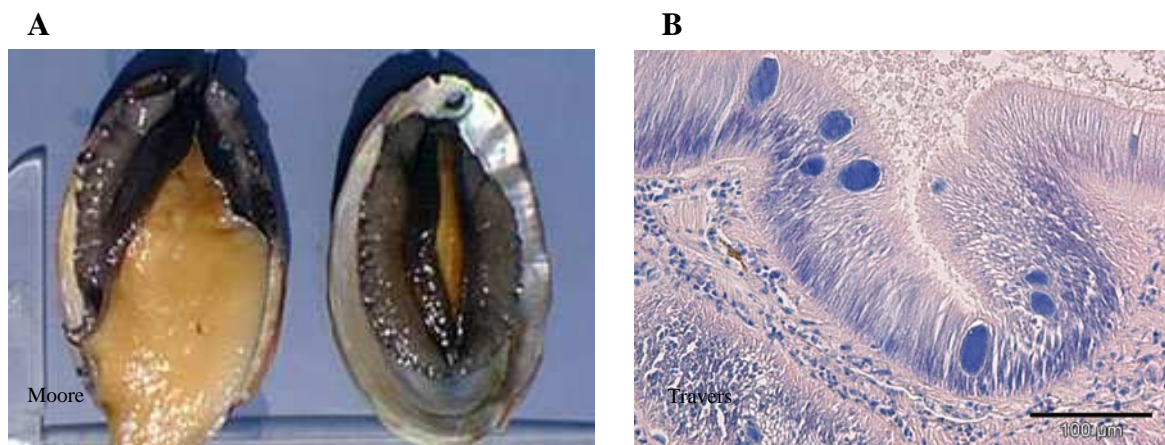


Figure 18 : Withering Syndrome

(A) Aspect d'un animal atteint par le WS (à droite). Photo J Moore. (B) Inclusions de *Candidatus Xenohalictis californiensis* (WS-RLP) au niveau oesophagien, coloration hématoxyline-éosine (Barre = 100 µm). Lame de référence Ifremer La Tremblade

De nombreux vibrions ont causé des mortalités chez les ormeaux, que ce soit en affectant le stade larvaire, les juvéniles ou les adultes. Ils sont décrits dans le paragraphe 2.3.4 p75.

1.4.4 Maladies virales

Les premières observations de maladies virales chez l'ormeau datent de la fin des années 1980. Ces observations ont été faites sur *H. discus discus*, *H. discus hanai* et *H. madaka* au Japon (Otsu & Sasaki 1997; Nakatsugawa *et al.* 1999). Le principal signe de **l'amyotrophie de l'ormeau** est une atrophie musculaire sévère au niveau du manteau et du pied, ce qui limite la nutrition des animaux. Des agents de type viral ont pu être observés en microscopie électronique à transmission au niveau des tissus nerveux (virus de 100 nm de diamètre), et la maladie a pu être reproduite expérimentalement à partir de broyats d'ormeaux filtrés à 0,22 µm. Cependant, aucun isolement de l'agent viral n'a été réalisé et les photos de microscopies électroniques publiées ont amené le comité *ad hoc* à ne pas reconnaître cette maladie comme maladie virale (Carolyn Friedman, communication personnelle).

La CSD (Crack Shell Disease) est une maladie virale chronique (Li *et al.* 1998b), reconnue par le comité *ad hoc*, qui entraîne un comportement léthargique, anorexique menant à 50% de mortalité chez *H. discus hanai* en 20 jours. Le premier rapport décrivant cette maladie concernait la Chine en 1993. Le virus mis en cause est un virus sphérique, enveloppé, de 90 - 140 nm de diamètre. La transmission par voie orale a permis de confirmer le caractère virulent de ce virus.

Très récemment, **des virus de type herpès** ont été détectés chez différentes espèces d'ormeaux, *H. diversicolor* (Chang *et al.* 2005), *H. laevigata*, *H. rubra* et leurs hybrides (Hooper *et al.* 2007b). Cette maladie est reconnue par le comité *ad hoc*.

Ayant débutées en janvier 2003, des mortalités massives et rapides (jusqu'à 70 à 80% de pertes cumulées) affectant l'ormeau *H. diversicolor supertexta* ont été observées dans le nord-est de Taiwan. Des analyses en histologie ont révélé la présence de lésions au niveau du tissu nerveux et des branchies (infiltration et nécrose) chez les animaux malades (Chang *et al.* 2005). Des particules virales présentant les caractéristiques ultrastructurales des herpès virus ont été observées en microscopie électronique à transmission. Des essais de transmission de la maladie, par injection (intra-musculaire) et par balnéation, ont permis de démontrer le pouvoir pathogène de ce virus à ADN.

Des fortes mortalités d'ormeaux australiens (*H. laevigata* and *H. rubra rubra*, ainsi que leurs hybrides) ont été observées en décembre 2005 dans trois fermes et en mai 2006 dans des populations naturelles au sud-est de l'Australie (Victoria, Figure 19A). Dans ce cas, les jeunes

stades étaient plus affectés que les animaux plus âgés avec des mortalités variant de 5% à 90% (Hooper *et al.* 2007b). Plusieurs facteurs de stress ont été impliqués comme les fortes densités d'animaux en élevage, la température de l'eau (au dessus de 17,5°C-18°C) et la maturation sexuelle. La maladie se traduit par un élargissement de la zone buccale, une protusion de la radula et une perte d'adhérence musculaire (Figure 19B). Des lésions du système nerveux ont été observées chez les ormeaux australiens et un virus de type herpes a pu être détecté en microscopie électronique à transmission.

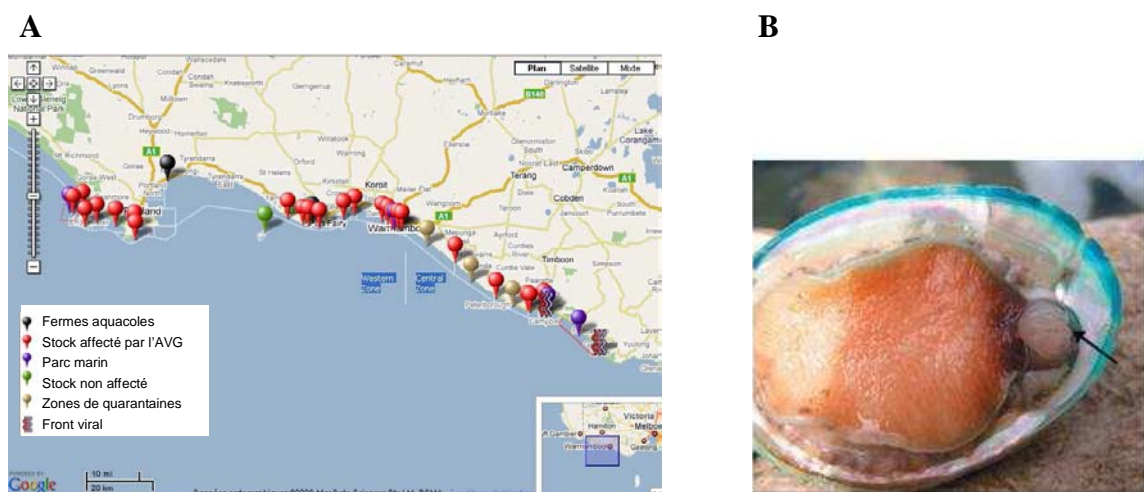


Figure 19 : L'herpès virus en Australie, localisation et symptômes

A. Localisation des infections signalées à l'herpès virus, selon le site Internet : <http://www.vada.com.au/Virus/CodeMap.htm>. B. Protusion de la bouche chez *H. laevigata* atteint de l'herpès virus (selon Hooper *et al.*, 2007).

De récentes études rapportent de nouvelles méthodes de purifications virales (Tan *et al.* 2008), et des travaux sont en cours sur les liens taxonomiques qui peuvent exister entre les herpes virus isolés en Australie, à Taiwan et en Europe sur l'huître *C. gigas*.

L'avancée du front viral en Australie est consultable en ligne (Figure 19A), et une vaste campagne d'information pour la sauvegarde des stocks a été mise en place en Australie.

2. LES VIBRIOS

2.1. Caractéristiques phénotypiques et génétiques

2.1.1 Caractéristiques phénotypiques

Les bactéries du genre *Vibrio* représentent la majorité des bactéries cultivables du milieu marin et estuarien. Elles appartiennent à la famille des *Vibrionaceae*, classe des γ -protéobactéries. Le genre *Vibrio* inclut 84 espèces bien identifiées (chiffre en perpétuelle évolution, <http://www.bacterio.cict.fr/uw/vibrio.html>, le 07 juillet 2008).

Ce sont de petits bacilles généralement isolés, Gram-négatif, de formes fréquemment incurvées ou droites, majoritairement mobiles de par la présence d'un ou plusieurs flagelles, et vivant en milieu aquatique, principalement marin. Ces bactéries sont mésophiles, chimio-organotrophes et anaérobies facultatives. Elles sont capables de pousser sur des milieux gélosés type « marine agar » et sur le milieu sélectif TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salt-sucrose agar). Sur ce milieu, dit sélectif pour les souches de *Vibrio*, les souches capables d'utiliser le sucrose forment des colonies jaunes, alors que les autres apparaissent vertes. Les températures optimales de croissance des souches de *Vibrio* se situent entre 15 et 30°C.

2.1.2 Classification et phylogénie

La classification des souches de *Vibrio* s'est d'abord reposée sur des critères phénotypiques (utilisation de différentes sources de carbone, tests enzymatiques (arginine dihydrolase, lysine et ornithine décarboxylase, gélatinase, chitinase, oxydase), susceptibilité à l'agent vibriostatique O/139, motilité, production d'indole, croissance à différentes températures, tolérance au sel, composition en GC% du génome). Mais devant la variabilité phénotypique au sein des espèces, des méthodes d'identifications génomiques se sont avérées nécessaires.

Une comparaison entre un consensus d'identification moléculaire – hybridation ADN-ADN, séquence de l'ARN ribosomal 16s (ARNr 16s) et AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – d'une part, et d'identification phénotypique d'autre part, a permis de mettre en évidence des erreurs de classements phénotypiques. C'est ainsi qu'il est apparu que *Vibrio harveyi*, *V. campbelli* et *V. rotiferianus* sont des espèces différentes indistinguables

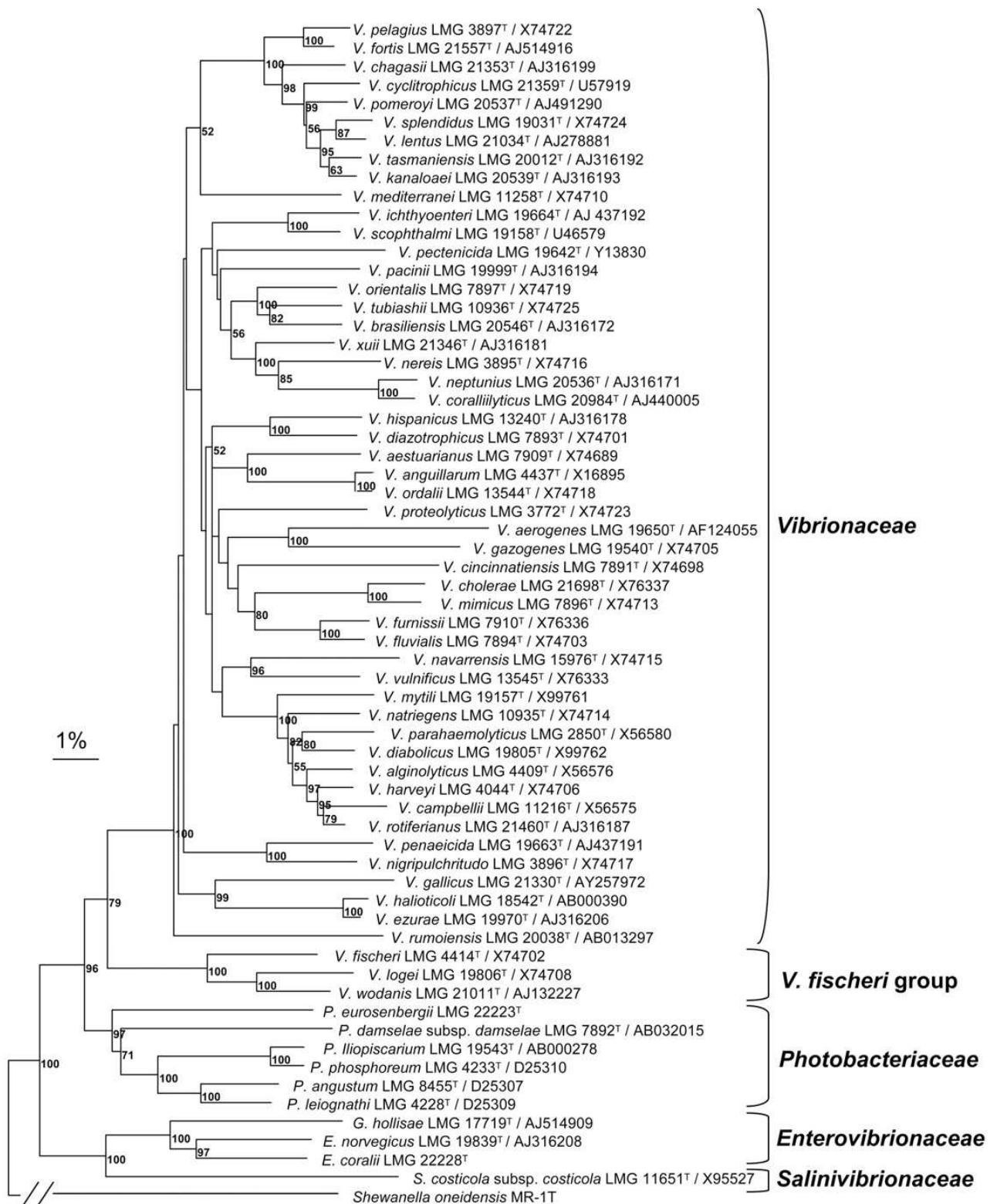


Figure 20 : Phylogénie des vibrions (selon Thompson *et al.*, 2004)
 Séquences concaténées des séquences codantes pour les gènes *recA*, *rpoA* et l'ARNr 16S

par des méthodes phénotypiques (Thompson *et al.* 2004). Ainsi, de par sa proximité avec *V. campbelli*, *V. rotiferianus* ou *V. alginolyticus*, l'identification de *V. harveyi* reste délicate et des approches lourdes comme la MLST (Multilocus Sequence Typing) basée sur la séquence de 7 gènes (*topA*, *pyrH*, *ftsZ*, *mreB*, *gyrB*, *recA*, *gapA*), ont été nécessaires pour séparer les différentes souches de ces vibrios (Thompson *et al.* 2007).

La phylogénie des souches du genre *Vibrio* s'est d'abord appuyée sur ces critères morphologiques et biochimiques, ce qui a amené à de nombreuses réorganisations des espèces et transfert entre genres. Puis la définition des espèces s'est précisée : les bactéries qui appartiennent à la même espèce ont au moins 70% de similarités (ou 80% d'homologie) lors d'hybridation ADN-ADN et une certaine cohérence phénotypique ; des bactéries ayant moins de 98,7% d'homologie dans la séquence complète de leur ARNr 16s sont d'espèce différente (la réciproque n'étant pas forcément vraie) (Paillard *et al.* 2004b; Thompson *et al.* 2004). La phylogénie actuelle est une approche polyphasique ; elle se repose sur ces critères (hybridation ADN-ADN, cohérence phénotypique), et sur les séquences de plusieurs gènes : l'ARNr 16s, *recA* et *rpoA*. L'arbre phylogénétique qui en découle est présenté dans la [Figure 20](#).

2.1.3 Caractéristiques génétiques

Les vibrios possèdent deux chromosomes circulaires : un grand chromosome (ou chromosome I), bien conservé, qui porte la plupart des gènes essentiels pour la croissance, la viabilité et la virulence; et un plus petit chromosome (ou chromosome II) qui contient plus de gènes relatifs à la régulation transcriptionnelle et au transport de substrat. La présence de ces deux chromosomes a d'abord été démontrée chez *V. cholerae* (Trucksis *et al.* 1998), et c'est le séquençage complet de la souche ATCC 39315 qui a permis de démontrer que la vaste majorité des gènes essentiels pour les fonctions cellulaires (réplication de l'ADN, transcription, traduction et synthèse des membranes) et pour la virulence (par exemple, les gènes codant pour les toxines, les antigènes de surfaces et les adhésines) sont localisés sur le grand chromosome (Heidelberg *et al.* 2000).

Ces caractéristiques ont, pour la plupart, été retrouvées lors des séquençages complets de *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.* 2003), *V. vulnificus* (Chen *et al.* 2003) et *V. fischeri* (Ruby *et al.* 2005).

Huit souches du genre *Vibrio* sont à ce jour séquencés : *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.* 2003), *V. fischeri* (Ruby *et al.* 2005), *V. salmonicida* (Haugen, Vibrio 2007), *V. harveyi*, 2 souches de *V. cholerae* et 2 souches de *V. vulnificus* (Chen *et al.* 2003), et pas moins de 22 autres séquençages complets sont actuellement en cours.

Le génome des vibrions est marqué par de nombreux réarrangements intra- et inter-chromosomiques, mais l'ensemble des gènes du chromosome I et leur position sont plutôt bien conservés (Chen *et al.* 2003; Makino *et al.* 2003). Ainsi, la taille du grand chromosome des vibrions, à l'exception de quelques souches, varie peu, entre 3 et 3,3 Mégabases. Par contre, les tailles du petit chromosome varient considérablement (entre 0,8 et 2,4 Mb) (Okada *et al.* 2005) (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition du génome des membres séquencés de la famille des vibrions

Souche	Taille des chromosomes (Mb)	GC %	Nombre de protéines codées	Nombre d'ARNt	Nombre de copies de l'ARNr 16s	Références
<i>V. cholerae</i>						
ATCC 39315	2,96 / 1,07	47,7 / 46,9 %	2737 / 1094	98	8	Heidelberg, 2000
ATCC 39541	3,02 / 1,11	46,9 / 47,8 %	2741 / 1133	92	7	Ref.Seq.NC_009456
<i>V. vulnificus</i>						
YJ016	3,35 / 1,86	46,4 / 47,2%	3262 / 1697	112	9	Chen, 2003
CMCP6	3,28 / 1,84	46,4 / 47,1%	2962 / 1564	112	9	Ref.Seq.NC_004459
<i>V. parahaemolyticus</i>						
RIMD 2210633	3,29 / 1,88	45,4 / 45,4 %	3080 / 1752	126	11	Makino, 2003
<i>V. harveyi</i>						
ATCC BAA116	3,77 / 2,20	45,5 / 45,3%	3570 / 2374	114	10	Ref.Seq.NC_009783
<i>V. fischeri</i>						
ATCC 700601	2,90 / 1,33	38,3 %	2585 / 1175	119	12	Ruby, 2005

Le petit chromosome est plus spécifique à chaque espèce, sa taille, sa composition étant plus variables selon les espèces. De plus, il contient beaucoup plus de gènes uniques que le chromosome I, et serait une source de gènes définissant peut-être le mode de vie spécifique à chaque espèce (Ruby *et al.* 2005). Il a été montré que, lors de la croissance de

V. cholerae in vivo (dans des intestins de lapin), et contrairement à ce qui est observé *in vitro*, de nombreux gènes du petit chromosome sont exprimés, ce qui amène les auteurs à lui attribuer un rôle dans l'adaptation au stress nutritionnel généré par l'hôte (Xu *et al.* 2003). Le petit chromosome pourrait venir de l'acquisition d'un mégaplasmide (origine de répllication plasmidique), probablement avant la diversification des souches du genre *Vibrio* (Heidelberg *et al.* 2000). Une seconde hypothèse attribue la présence du petit chromosome à une excision d'un chromosome ancestral de grande taille (Waldor & RayChaudhuri 2000).

Une caractéristique physiologique intéressante des vibrions est leur temps de répllication extrêmement court. Celui-ci peut atteindre 9 minutes chez *V. natrigens* et 10 minutes chez *V. parahaemolyticus*. Cela se traduit au niveau génomique par une plus grande quantité de gènes transcrits en ARN ribosomiaux (ARNr) et ARN de transfert (ARNt). Les vibrions ont entre 8 et 15 copies d'ARNr 16s (contre 1 à 7 chez la plupart des bactéries dont les génomes sont séquencés) et entre 92 et 126 ARNt (contre en moyenne 50 chez les autres bactéries séquencées) (Reen *et al.* 2006) (Tableau 2).

2.2. Habitat et cycle de vie

Dans l'environnement, les vibrions peuvent coloniser les vertébrés et invertébrés marins, ou peuvent être associés à des algues ou du plancton, ou encore former des biofilms, ce qui leur permet de persister dans leur environnement. Dans certaines conditions environnementales, certains vibrions deviennent non cultivables, sans perdre leur activité respiratoire. Ce phénomène est appelé l'état «viable mais non cultivable » (ou VBNC).

Certains vibrions sont non pathogènes ; certains sont même symbiotiques. *V. mediterranei* joue le rôle de premier colonisateur digestif du turbot, et prévient la colonisation par des bactéries opportunistes. *V. fischeri* joue un rôle important dans le développement des organes lumineux des juvéniles de calmar, et, par émission de lumière, dans la communication, l'attraction des proies, et la fuite des prédateurs (Ruby *et al.* 2005). Dans les organes lumineux de calmar, la densité bactérienne peut atteindre 10^{11} cellules/organe. Chez les ormeaux, *V. halioticoli* est une espèce non pathogène, symbiotique, colonisant le système digestif des animaux. Il a été isolé chez *H. discus hannai*, *H. diversicolor*, *H. discus discus* et *H. midae*. Il représente 40 à 65% de la flore intestinale des ormeaux, et, de par sa capacité à fermenter l'alginate (composant majeur des algues brunes)

en acide acétique, il jouerait un rôle dans le processus de digestion (Sawabe *et al.* 1998; Tanaka *et al.* 2001; Sawabe *et al.* 2002; Tanaka *et al.* 2002; Sawabe *et al.* 2003).

De nombreux vibrions sont de puissants pathogènes pour les poissons, les invertébrés marins, les coraux et les mammifères. Le plus documenté et le plus connu des vibrions est *V. cholerae*, l'agent étiologique du choléra. C'est l'espèce type des vibrions.

2.3. Les vibrions pathogènes

Avant d'énumérer les différents vibrions pathogènes que l'on peut rencontrer chez les vertébrés et les invertébrés, il est bon de rappeler la définition d'un pathogène. Celle-ci s'appuie principalement sur le postulat de Koch, publié en 1890. Pour être considéré comme responsable d'une maladie, donc pathogène, un agent bactérien doit remplir les conditions suivantes : (1) L'agent supposé pathogène doit être trouvé systématiquement dans chaque organisme atteint de maladie ; (2) L'agent supposé pathogène doit être extrait d'un organisme atteint, isolé et cultivé en laboratoire ; (3) L'agent supposé pathogène doit reproduire les mêmes symptômes de la même maladie lorsqu'il est inoculé à un organisme sain de l'espèce dont il provient et (4) L'agent pathogène doit être retrouvé dans l'organisme expérimentalement inoculé et reconnu comme identique à l'agent causal original suspecté.

Un postulat « moléculaire » a été émis par Fazlkow en 1988 afin de définir les facteurs de virulence bactériens, et permet d'adapter le postulat de Koch aux bactéries non cultivables (Paillard *et al.* 2004b). Un facteur peut être défini comme facteur de virulence s'il satisfait les quatre conditions suivantes : (1) Ce composé n'est trouvé que dans l'espèce pathogène ; (2) L'inactivation par mutation d'un ou plusieurs gènes potentiellement associés à la pathogénicité diminue la virulence de l'espèce pathogène ; (3) La réintroduction dans le mutant du gène non muté doit restaurer la virulence ; et (4) Le gène doit être exprimé *in vivo*, pendant le processus infectieux.

Différentes catégories d'agent infectieux peuvent être décrites, selon leur pouvoir pathogène : les microorganismes hautement pathogènes et les microorganismes opportunistes. Les premiers provoquent, dès qu'ils sont présents, presque toujours un processus infectieux aigu (maladie) ou inapparent. Les microorganismes opportunistes sont des agents potentiellement pathogènes, mais qui ne provoquent pas la maladie dans toutes les circonstances. Ils ont besoin de conditions favorables, comme un affaiblissement de l'organisme hôte pour prendre le dessus. Ainsi, l'interaction entre un hôte et son pathogène

est fonction de l'hôte, du pathogène, mais également des facteurs environnementaux influençant l'un ou l'autre des partenaires.

2.3.1 Chez l'Homme

Les espèces *V. cholerae*, *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus* sont les trois espèces de vibrions les plus décrites, associées à des pathologies humaines, et les plus dangereuses pour l'homme.

V. cholerae

Le choléra est la maladie infectieuse épidémique due à *V. cholerae*, caractérisée par des diarrhées brutales et très abondantes. Celles-ci peuvent entraîner une déshydratation sévère pouvant mener à la mort en l'absence de traitement rapide. Le choléra est une maladie se développant principalement dans les pays en développement, à cause des problèmes d'approvisionnement en eau et de l'état sanitaire (Pour revue Colwell 2004). Les souches appartenant aux sérogroupes O1 et O139 de *V. cholerae* (groupes établis à partir de l'antigène O, composant des lipopolysaccharides de la membrane) sont les souches les plus virulentes.

Jusqu'en 1992, *V. cholerae* O1 (bacille isolé en 1883 par Koch en Egypte) était le seul agent connu du choléra. *V. cholerae* séro-groupe O1 est subdivisé en deux groupes : le biotype classique et biotype El Tor, qui est répandu sur toute la planète et est à la base de 7^{ème} pandémie de choléra que subit actuellement la planète (Sack *et al.* 2004). En 2005, 131 943 cas et 2 272 décès ont été déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé par 56 pays, l'Afrique étant le continent le plus touché aux vues du nombre de cas signalés (125 082 cas) (<http://www.who.int/topics/cholera/wer/en/index.html>).

En 1992, une souche, appartenant à un nouveau séro-groupe - O139 - est apparue en Inde et au Bangladesh. Ce vibrion est aujourd'hui responsable d'épidémies dans plusieurs pays d'Asie et pourrait être à l'origine d'une huitième pandémie cholérique (Alam *et al.* 2006).

Au niveau de l'environnement marin, *V. cholerae* se retrouve sous forme libre, ou s'attache aux surfaces des plantes, algues filamenteuses, copépodes (zooplancton), ou crustacés. La transmission à l'homme, par la consommation d'eau ou de nourriture contaminée, est suivie d'une colonisation intestinale, menant aux diarrhées responsables de la sévère déshydratation caractéristique du choléra (Figure 21).

Une corrélation entre la dynamique d'émergence de *V. cholerae* et les oscillations climatiques liées au phénomène El Nino, qui favorisent la multiplication du vibron au sein des blooms de phytoplancton et de zooplancton (Lipp *et al.* 2002).

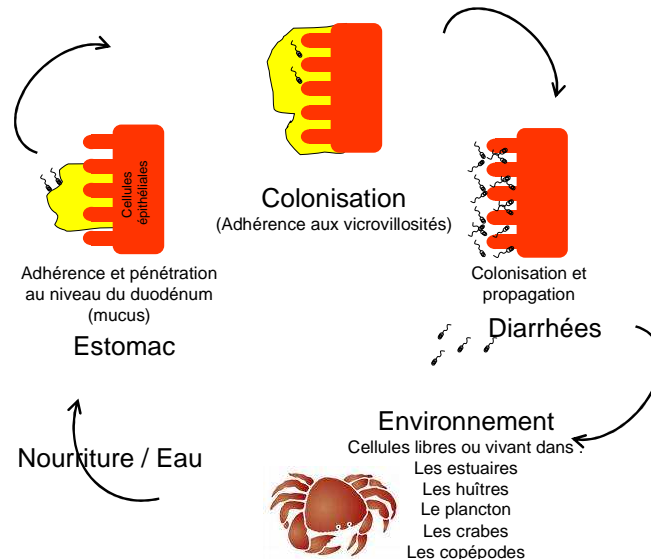


Figure 21: Cycle infectieux de *V. cholerae* (selon Reidl *et al.*, 2002)

Représentation simplifiée du cycle infectieux de *V. cholerae* (en noir) colonisant l'estomac puis pénétrant le mucus (en jaune) présent sur les cellules épithéliales intestinales (en rose), avant de causer les symptômes du choléra, qui permettent sa propagation dans l'environnement.

V. vulnificus

V. vulnificus est l'agent étiologique d'infections sévères faisant suite à des blessures ou à l'ingestion de fruits de mer contaminés. Des infections opportunistes, chez des individus sensibles causent généralement la mort en 24 à 48 heures.

Cette bactérie est halophile, abondamment présente dans les écosystèmes estuariens, et dans les eaux saumâtres. Sa multiplication est favorisée par des températures supérieures à 20°C et une salinité modérée (15 - 25 g/L), mais elle est capable de persister, en passant en stade VBNC à des températures très froides allant jusqu'à -20°C (Johnston & Brown 2002). Sa répartition géographique est vaste : Japon, Corée, Taiwan, USA, Australie, Israël, Italie, France, Espagne, Belgique, Allemagne, Hollande, Suède... *V. vulnificus* se trouve à l'état libre dans l'eau ou associé au zooplancton et aux algues. Il est également retrouvé dans de nombreux mollusques marins, comme les huîtres, les moules ou les coquilles Saint-Jacques, qui se contaminent par filtration de l'eau (Pour revue Chakraborty *et al.* 1997).

V. vulnificus peut entraîner, suite à l'ingestion d'huîtres contaminées par des individus souffrant de maladies chroniques du foie, des septicémies aboutissant dans 50% des cas à la

mort des patients. Les infections à *V. vulnificus* peuvent également survenir suite à la contamination de blessures par de l'eau contaminée, ou par la manipulation de mollusques contaminés. Dans ce cas, le taux de mortalité est d'environ 25%.

Une fois entrée dans l'organisme, la bactérie cause des réactions fulminantes dans les tissus conjonctifs, entraînant des boursouffures et des nécroses hémorragiques. Même dans les cas où l'infection n'est pas fatale, l'endommagement des tissus amène fréquemment à l'amputation de membres.

V. parahaemolyticus

V. parahaemolyticus est l'agent responsable de gastroentérites liées à la consommation de coquillages (notamment les huîtres), de crustacés (comme les crabes) ou de poissons crus (Makino *et al.* 2003).

V. parahaemolyticus est présent dans l'environnement marin (eaux côtières et estuariennes). Il a été isolé des eaux côtières de très nombreux pays répartis dans les cinq continents. Il se trouve à l'état libre dans l'eau, associé au zooplancton et aux algues, contamine les mollusques bivalves (huître, moule, coquille Saint-Jacques), les mollusques gastéropodes (bigorneaux, ormeaux, escargots), les crustacés (crevettes, crabes, araignées de mer, homards), les céphalopodes (calamars, encornets) et les poissons (sardines, anchois, anguilles, mérus, maquereaux...).

Douze à vingt-quatre heures après ingestion des coquillages, crustacés ou poissons contaminés, les malades présentent une diarrhée acqueuse, des crampes abdominales, des nausées, des vomissements, des maux de tête. L'évolution est souvent bénigne, mais environ 10 % des malades doivent être hospitalisés et le taux de mortalité peut atteindre 2 % (Pour revue Su & Liu 2007).

Autres vibrions pathogènes

D'autres vibrions ont également été associés à des infections humaines : *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii* et *V. cincinnatiensis* (Pour revue Tantillo *et al.* 2004). Ils sont généralement à la base d'infections de coupures ou de gastroentérites, mais le nombre de cas cliniques associés reste limité.

2.3.2 Chez les vertébrés marins

V. anguillarum

V. anguillarum est un agent infectieux affectant plus d'une cinquantaine de poissons comme l'anguille *Anguilla anguilla*, chez laquelle cette bactérie a été isolée au début du 20^e siècle. Ce pathogène pose de réels problèmes en aquaculture, surtout pour les salmonidés.

Il affecte les saumons du Pacifique et de l'Atlantique (*Oncorhynchus* sp. et *Salmo salar*), les truites (*O. mykiss*), les turbots (*Scophthalmus maximus*), les dorades (*Sparus aurata*), les bars rayés (*Morone saxatilis*), les morues (*Gadus morhua*), les anguilles (*A. japonica* et *A. anguilla*), et les ayus (*Plecoglossus altivelis*). *V. anguillarum* induit une septicémie hémorragique particulièrement rapide, une nécrose du cœur, des reins et de la rate, et une exophtalmie et opacification de la cornée. Cette bactérie est particulièrement connue pour son plasmide pJM1 portant des facteurs de virulence associés au métabolisme du fer, qui sera détaillé plus bas (paragraphe 2.7.2, p 95).

V. salmonicida

V. salmonicida (ou *Vibrio* tueur de saumon) est l'agent étiologique de la maladie d'Hitra ou « vibriose des eaux froides » affectant principalement le saumon *S. salar*, la morue *G. morhua* et la truite arc-en ciel *O. mykiss* les mois d'hiver, quand les températures sont inférieures à 15°C (Thompson *et al.* 2004). Cette maladie est synonyme de septicémie hémorragique et a été décrite principalement au Canada et dans les pays de l'Europe du Nord (Norvège et Royaume-Uni).

Autres vibrions pathogènes

D'autres vibrions ont également été isolés lors de mortalités de poissons, causant généralement des septicémies hémorragiques : *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. fischeri*, *V. furnisii*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. ordalii*, *V. pelagius*, *V. splendidus*, *V. trachuri*, *V. viscosus*, *V. vulnificus* ou *V. tapetis*.

2.3.3 Chez les coraux

Le blanchiment du corail résulte de l'interruption d'une symbiose entre le corail et des micro-algues endosymbiotiques, les zooxanthelles. La maladie de blanchiment des coraux peut avoir diverses origines, l'une d'entre elle étant la présence de bactéries pathogènes. Les deux principales espèces de vibrions affectant les coraux sont *V. coralliilyticus* et *V. shiloi* (aussi appelé *V. shilonii* ou *V. mediterranei*).

V. coralliilyticus a été isolé de coraux malades (*Pocillopora damicornis*) en Mer Rouge et également de larves de mollusques (*C. gigas* et *Nodipecten nodosus*). Toutes les souches sont pathogènes chez *P. damicornis* et entraînent expérimentalement 50 à 100% de lyse tissulaire en 1 à 2 semaines. La température est un facteur clé pour le développement de la maladie ; une température supérieure ou égale à 27°C permet une lyse complète des coraux en 2 semaines avec seulement 30 bactéries / ml, alors que les coraux placés à 25°C ne présentent aucun signe clinique. Ceci est certainement à lier à une sensibilité accrue des coraux à forte température et à l'expression température dépendante d'une protéase extracellulaire, potentiellement impliquée dans la virulence.

V. shiloi a été identifié comme l'agent étiologique du blanchiment d'*Oculina patagonica*. L'adhésion, la pénétration et la multiplication (jusqu'à 10⁹ UFC / cm³ en 5 jours) sont bien connues : par chimiotactisme, *V. shiloi* se fixe sur une protéine du mucus du corail (β -galactoside containing receptor) produite uniquement en présence du zooxanthelle photosynthétique actif, puis pénètre les cellules de l'épiderme, se différencie en cellule non cultivable (VBNC). S'en suivent les étapes de multiplication intracellulaire, et de production de toxines inhibant la photosynthèse, ce qui blanchit le corail et lyse les zooxanthelles (Pour revue Rosenberg & Falkovitz 2004). La plupart des facteurs de virulence de *V. shiloi* sont régulés par la température, et seront décrits plus loin (paragraphe 2.7 et 2.8, p 91 et 99).

Récemment, des cas de résistance à *V. shiloi* ont été rapportés. Il s'avère que ce caractère résistant est lié à l'acquisition par le corail d'une souche probiotique, qui prévient l'action de *V. shiloi* (Rosenberg *et al.* 2007). Cette découverte a amené Rosenberg et ses collaborateurs à envisager la théorie de l'hologénome, c'est-à-dire à prendre en considération, non pas le génome d'un hôte, mais le génome de l'ensemble hôte – bactéries symbiotiques. En effet, l'évolution d'un hôte pourrait se faire, non pas uniquement par l'acquisition de nouveaux gènes, mais aussi par l'acquisition de nouveaux symbiotes, qui ont des capacités de transfert horizontaux bien plus étendues que les eucaryotes (Rosenberg *et al.* 2007).

2.3.4 Chez les invertébrés marins

Chez les crustacés

Les crevettes sont les crustacés les plus touchés par des vibrioses. Des pathogènes humains (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ou encore *V. damsela*), comme des pathogènes plus spécifiques des invertébrés (*V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*) ont pu être isolés dans des épisodes de mortalités.

En Nouvelle Calédonie, deux maladies ont fortement perturbé la production de crevettes. La première est connue sous le nom de « Syndrome 93 » et est attribuée à *V. penaeicida*. C'est une pathologie contagieuse, véhiculée par l'eau, et associée à de faibles températures. En effet, des exotoxines produites par *V. penaeicida* sont émises à 20°C mais pas à 30°C (Goarant *et al.* 2000). L'effet toxique de la bactérie a été validé par balnéation et injection (Saulnier *et al.* 2000). Les deux facteurs influençant son apparition sont une faible température et la période de mue des crevettes (Le Moullac, 1997).

La deuxième maladie est le syndrome d'été, attribué à *V. nigripulchritudo* (Goarant & Merien 2006; Goarant *et al.* 2006). Cette maladie apparaît sous forme de brèves flambées épizootiques et cause jusqu'à 75% de mortalités. Seule une antibiothérapie préventive avec de l'oxytétracycline a permis de diminuer les mortalités. Cette vibriose septicémique dépend de l'état physiologique et immunitaire de l'animal. Le pathogène a pu être évalué à 10^3 - 10^4 UFC/ml dans l'eau interstitielle, et dans la colonne d'eau entre 2.10^2 et 2.10^3 UFC/ml (Lemonnier 2007), correspondant aux doses efficaces en pathologie expérimentale (Saulnier *et al.* 2000). Un plasmide pSNF1, potentiel support de la pathogénicité, a été isolé chez ce vibron, et présenté dans le paragraphe 2.6, p83.

V. harveyi est un pathogène important chez la crevette, et il sera détaillé dans le paragraphe 2.4, p79.

Chez les mollusques

Chez les mollusques bivalves, les mortalités associées à des infections bactériennes sont le plus fréquemment associées à des bactéries du genre *Vibrio*. Ces mortalités touchent principalement les larves et juvéniles de bivalves (Pour revue Paillard *et al.* 2004b). Nous

pourrions citer *V. tubiashii* qui affecte les larves d'huîtres, *V. alginolyticus* et *V. anguillarum* qui affectent les huîtres et les myes, *V. splendidus* qui affecte l'huître *C. gigas* et *V. pectinica* qui affecte la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*. Cependant, de nombreux pathogènes affectant les larves de bivalves ne sont pas identifiés au-delà du genre.

Chez les mollusques bivalves adultes, un nombre plus restreint de vibrioses ont été décrites, les plus connues étant *V. tapetis*, responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philipinarum* plutôt considérée comme une maladie d'eau froide (Paillard *et al.* 1994; Paillard & Maes 1995a, b); et *V. splendidus* et *V. aesturianus* responsables des mortalités estivales d'huîtres juvéniles et d'adultes, influencés par des températures élevées (Lacoste *et al.* 2001; Waechter *et al.* 2002; Labreuche *et al.* 2006; Garnier *et al.* 2007).

Chez les ormeaux, de nombreux vibrions ont causé des mortalités, que ce soit en affectant le stade larvaire, les juvéniles ou les adultes. Le tableau 2 reprend les études relatant ces mortalités. Le lien avec un stress thermique ayant souvent été suggéré dans ces études, il est également indiqué dans le tableau.

V. alginolyticus a été isolé de larves véligères et de post-larves de 4 jours chez l'ormeau rouge *H. rufescens*, au Mexique (Anguiano *et al.* 1998). Après infection par balnéation, les larves arrêtent de nager, sédimentent et meurent à hauteur de 95% en 48 h. *V. alginolyticus* affecte également les petits ormeaux (10-14g) en Chine (Lee *et al.* 2001; Liu *et al.* 2001). Les symptômes (abcès ou ulcères sur le manteau et perte de poids importante) ont été reproduits en infection expérimentale par injection de bactéries ou de surnageants de culture. Ces bactéries induisent de plus fortes mortalités à haute température. Leur virulence a été testée par injection en fonction de la température : les DL50 (Doses létales 50) obtenues étaient de $1,5 \cdot 10^6$ CFU/g à 18°C et $6,2 \cdot 10^1$ CFU/g à 30°C en 2 jours).

D'autres vibrions tels *V. splendidus I*, *V. tubiashii*, *V. anguillarum* ont été isolés sur des ormeaux adultes moribonds issus de l'aquaculture ou pêchés en Australie (Handlinger *et al.* 2005) mais n'ont pas été caractérisés plus précisément.

Tableau 2 : vibrions associés à des mortalités d'ormeaux

Les souches de *Vibrio* ayant été associées à des mortalités de différentes espèces d'ormeaux sont indiquées. Le stade qu'elles affectent, les doses létales 50 (DL50), et les mortalités induites par baignade sont présentés. (+) Induction thermique positive. n.d. non déterminé.

Vibrio	Espèce d'ormeau touchée	Stade infecté	DL50 suite à des injections (CFU/g)	Mortalités suite à des baignades (10 ⁵ B/ml)	Induction thermique	
<i>V. alginolyticus</i>	<i>H. rufescens</i>	Larves et post-larves	n.d.	95% en 48h	n.d.	Anguiano <i>et al.</i> 1998
	<i>H. diversicolor supertexta</i>	Petits ormeaux (10-14g)	1,5.10 ⁶ à 18°C et 6,2.10 ¹ à 30°C en 2j	n.d.	+	Lee <i>et al.</i> 2001
		Petits ormeaux (10-15g)	1,6.10 ⁵ en 2 jours	n.d.	n.d.	Liu <i>et al.</i> 2001
<i>V. para-haemolyticus</i>	<i>H. diversicolor supertexta</i>	?	100% de mortalités en 3j (1,6.10 ⁵)	n.d.	+	Cheng <i>et al.</i> 2004a
		Petits ormeaux	n.d.	4-7 jours	+	Huang <i>et al.</i> 2001
		Post-larves	1.10 ³ en 3 jours	70% en 3 jours	n.d.	Cai <i>et al.</i> 2006
		Petits ormeaux (10-145g)	2,7.10 ⁶ à 18°C et 8,4.10 ⁴ à 30°C en 2j	n.d.	+	Lee <i>et al.</i> 2001
	<i>H. rufescens</i>	20 - 150 mm	n.d.	n.d.	n.d.	Elston et Lockwood 1983
<i>V. fluvialis</i> II	<i>H. discus hannai</i>	30 - 80 mm	n.d.	50-60% en 7 jours 100% par injection	n.d.	Li <i>et al.</i> 1998
<i>V. harveyi</i>	<i>H. tuberculata</i>	Adultes matures	n.d.	60-80% en 10 jours	+	Nicolas <i>et al.</i> 2002
	<i>H. tuberculata</i>	Adultes et jeunes adultes matures	2,5.10 ² CFU/ormeau en 2,5 jours	60-80% en 5 jours (jeunes adultes) ou 10 jours (adultes)	+	Travers <i>et al.</i> soumis (articles 1, 5)
	<i>H. diversicolor supertexta</i>	Petits ormeaux 20 mm	n.d.	80% en 4 jours	n.d.	Nishimori <i>et al.</i> , 1998
	<i>H. diversicolor supertexta</i>	Adultes de 10-50 mm	6,4.10 ⁵ en 2 jours	100% en 10 jours	+	Sawabe <i>et al.</i> , 2007
	<i>Haliotis rubra</i> , <i>H. laevigata</i> et leurs hybrides	Ormeaux pêchés et venant de fermes >1cm	n.d.	n.d.	n.d.	Handler <i>et al.</i> , 2005
<i>V. tubiashii</i>	<i>Haliotis rubra</i> , <i>H. laevigata</i> et leurs hybrides	Ormeaux pêchés et venant de fermes >1cm	n.d.	n.d.	n.d.	Handler <i>et al.</i> , 2005
<i>V. anguillarum</i>	<i>Haliotis rubra</i> , <i>H. laevigata</i> et leurs hybrides	Ormeaux pêchés et venant de fermes >1cm	n.d.	n.d.	n.d.	Handler <i>et al.</i> , 2005
<i>V. splendidus</i> I	<i>Haliotis rubra</i> , <i>H. laevigata</i> et leurs hybrides	Ormeaux pêchés et venant de fermes >1cm	n.d.	n.d.	non	Handler <i>et al.</i> , 2005

Le syndrome de blanchissement des ormeaux (décoloration des organes, diminution de l'activité) a d'abord été décrit aux Etats-Unis, associé à la température, à la disponibilité en aliments, et à la présence de bactéries (WS-RLP) et de parasites (Moore *et al.*, 2001). Des symptômes similaires au 'Withering Syndrome' (WS) ont aussi été associés à la présence de souches de *V. parahaemolyticus* ont été décrits par Liu *et al.* (2000) et Huang *et al.* (2001) sur des ormeaux cultivés, et ont été reproduits en infections expérimentales avec les bactéries ou leurs surnageants de culture. Comme pour le WS, la température semble être un des facteurs favorisant des mortalités (Huang *et al.* 2001). *V. parahaemolyticus* est ainsi un pathogène reconnu pour les ormeaux taiwanais *H. diversicolor supertexta* (Liu *et al.* 2000; Cheng *et al.* 2004a) et pour les ormeaux californiens *H. rufescens* (Elston & Lockwood 1983). Il touche les petits ormeaux, ainsi que les larves et post-larves (Huang *et al.* 2001; Cai *et al.* 2006).

La maladie des pustules blanches a été décrite dans plusieurs structures d'élevage d'ormeaux d'*H. discus hannai* à partir de 1993, avec des taux de mortalité de 50-60 % (Li *et al.* 1998a). Différentes souches de *V. fluvialis* II ont été isolées et la maladie a été reproduite en infection expérimentale par injection dans le muscle pédieux, ou suite à des blessures provoquées sur le pied suivies d'une balnéation dans une suspension bactérienne. Dans ces deux cas, 100% de mortalités ont été obtenues.

Des symptômes similaires (pustules blanches) ont été également observés dans des populations sauvages et d'élevage d'*H. tuberculata* le long de la côte atlantique française, avec des taux de mortalité de plus de 60 % (Nicolas *et al.* 2002). Une bactérie majoritaire a été isolée des animaux sauvages malades et identifiée comme appartenant à l'espèce *V. carchariae* (synonyme de *V. harveyi*). Les mortalités ont été reproduites après mise en contact avec des broyat d'animaux infectés ou de l'eau où ils avaient séjourné, après injection de suspension bactérienne dans le muscle du pied, ou après balnéation dans une suspension bactérienne. L'interaction entre les ormeaux et *V. harveyi* fera l'objet de la troisième partie de cette introduction (p110).

V. harveyi a également été isolé au Japon (Nishimori *et al.* 1998; Sawabe *et al.* 2007) et en Australie (Handlinger *et al.* 2005) lors de mortalités d'ormeaux *H. diversicolor supertexta*, *H. rubra* ou *H. laevigata*.

2.4. *V. harveyi*

V. harveyi est un bacille droit, mobile par la présence d'une ciliature polaire (culture en milieu liquide) ou d'une ciliature polaire et péritriche (culture en milieu solide), pouvant parfois essaimer sur milieu solide (environ 13% des souches). Même si *V. harveyi* est une bactérie luminescente, pouvant induire la « maladie lumineuse » des crevettes, toutes les souches ne sont pas luminescentes (celles affectant les ormeaux par exemple ne le sont pas). *V. harveyi* vit principalement dans les eaux de mers chaudes et les sédiments marins, il peut coloniser différents substrats, et être associé à du zooplancton ou des micro-algues par exemple.

V. harveyi touche un large spectre d'animaux marins : requins, poissons, crustacés et mollusques. Des souches de *V. harveyi* ont été isolées de requins élevés en captivité présentant une nécrose des reins, des lésions musculaires et conjonctives surtout autour des abcès sous-cutanés : requin gris (*Carcharhinus plumbeus*) et requin-citron (*Negaprion brevirostris*). Le [tableau 3](#) présente les espèces cultivées infectées par cette bactérie. Dans la plupart des cas, cette vibriose se traduit par un ralentissement de l'activité musculaire et une septicémie hémorragique qui induit de très fortes mortalités. Des épisodes de mortalités associés ont été rapportés chez les crevettes *Penaeus monodon* et *P. vannamei* en Indonésie, en Thaïlande, en Inde, aux Philippines, en Australie, à Taiwan et en Equateur (Saulnier *et al.* 2000).

V. harveyi a également été impliqué dans les maladies des coraux *O. patagonica* et la maladie de la bande blanche chez *Acropora cervicornis*.

La virulence des différentes souches de *V. harveyi* peut être qualifiée de spécifique vis-à-vis de leur hôte : ceci a été prouvé en faisant des expériences croisées chez les crevettes *P. vannamei* et *P. monodon*, avec des souches originaires d'Equateur et de Thaïlande (Le Groumellec *et al.* 1995; Saulnier *et al.* 2000). Pizzutto et Hirst (1995) ont proposé que la spécificité de virulence des souches serait associée à des plasmides ou phages, acquis par les souches et leur conférant leur virulence.

Tableau 3 : Maladies d'animaux d'élevage associées à *V. harveyi* (adapté de Defoirdt *et al.* 2007b)

Organisme hôte	Maladie	Références
Crustacés		
Artémia (<i>Artemia franciscana</i>)	45 – 80 % de mortalités	Soto-Rodriguez <i>et al.</i> , 2003
Crevette impériale (<i>Penaeus japonicus</i>)	Fortes mortalités sans signes particuliers	Liu <i>et al.</i> , 1996b
Boucot du pacifique (<i>Sicyonia ingntis</i>)	55% de mortalités	Martin <i>et al.</i> , 2004
Homard (<i>Jasis verreauxi</i>)	«Luminous disease» 75% de mortalités larvaires	Diggle <i>et al.</i> , 2000
Crevette géante tigrée (<i>P. monodon</i>)	«Luminous disease» mortalités massives	Lavilla-Pitogo <i>et al.</i> , 1990
Crevette à pattes blanches (<i>L. vannamei</i>)	85% de mortalités au stade nauplii	Anguirre-Guzman <i>et al.</i> , 2001
Poissons		
Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	Gastroentérites suivies de mortalités massives	Liu <i>et al.</i> , 2004
Mérou à taches oranges (<i>Epinephelus coioides</i>)	Gastroentérites suivies de mortalités massives	Lee <i>et al.</i> , 2002
Tambour rouge (<i>Scaenops ocellatus</i>)	Gastroentérites suivies de mortalités massives	Liu <i>et al.</i> , 2003
Saumons	Jusqu'à 100% de mortalités	Zhang <i>et al.</i> , 2000
Hippocampe (<i>Hippocampus</i> sp.)	Hémorragies suivie de plus de 90% de mortalités	Alcaides <i>et al.</i> , 2001
Cardeau d'été (<i>Paralichthys dentatus</i>)	Entérite nécrotique	Soffientino <i>et al.</i> , 1999
Mollusques		
Ormeau européen (<i>Haliotis tuberculata</i>)	60 – 80 % de mortalités	Nicolas <i>et al.</i> , 2002
Ormeau japonais (<i>Haliotis diversicolor</i>)	Mortalités massives	Sawabe <i>et al.</i> , 2007
Ormeau japonais (<i>Haliotis diversicolor</i>)	Mortalités massives	Nishimori <i>et al.</i> , 1998
Huître perlière (<i>Pinctada maxima</i>)	Mortalités massives	Pass <i>et al.</i> , 1987

V. harveyi est également connue pour ses propriétés hyper-mutagènes et sa capacité à développer des résistances aux antibiotiques (Nakayama *et al.* 2006a). *V. harveyi* a ainsi été proposé comme potentiel bio-indicateur des pollutions marines, en remplacement de la souche de *Salmonella enterica* utilisée dans le test de Ames (Czyz *et al.* 2000; Czyz *et al.* 2002; Czyz *et al.* 2003). Le test de Ames consiste à évaluer la capacité d'induction de reversion par une substance chimique chez certaines souches de *S. enterica* porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine, et donc incapables de pousser en absence d'histidine. Le test de Ames quantifie le taux de réversion His- / His+ en présence de substances à tester, par la capacité des souches à pousser sur un milieu sans histidine. Cependant, en présence d'eau de mer, le taux de survie de *S. enterica* est relativement faible. Le test de Ames adapté à *V. harveyi* présente une sensibilité équivalente, et même supérieure quand il s'agit d'échantillons marins (Czyz *et al.* 2002; Nakayama *et al.* 2006a).

Enfin, *V. harveyi* est surtout connu pour son quorum sensing, c'est-à-dire la capacité des bactéries à dialoguer entre elles. Le quorum sensing (qui sera détaillé dans le paragraphe 2.10 p104) se traduit fréquemment par l'émission de lumière, ou luminescence, observable la nuit, comme dans le cas de la vibriose des crevettes (Figure 22), ou dans une étude surprenante relatant de l'observation satellitaire de *V. harveyi*. En effet, *V. harveyi*, de par sa luminescence a pu être observé sur 15 000 km² lors d'un bloom de micro-algues (*Phaeocystis* sp.) dans l'océan indien (Miller *et al.* 2005).

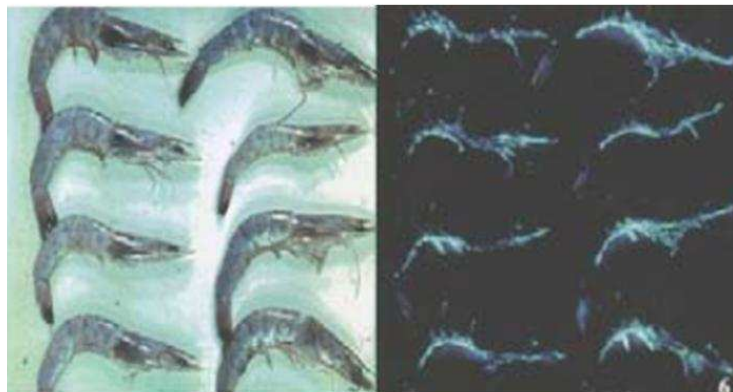


Figure 22 : Maladie lumineuse des crevettes causée par *V. harveyi* (selon Defoirdt, 2005)

Des crevettes infectées par *V. harveyi* sont observées à la lumière (à gauche) ou dans le noir (à droite) où la luminescence naturelle des bactéries est révélée.

Mais la détection des vibrions n'est pas toujours aussi aisée, et limite bien souvent la compréhension des mécanismes infectieux.

2.5. Détection et localisation des vibrions

Les méthodes de détection et de localisation les plus utilisées afin de comprendre les différents modèles de vibrioses et d'identifier les souches de *Vibrio* dans les différents compartiments animaux et environnementaux sont principalement : l'histologie, l'immunohistochimie, la bactériologie et des méthodes moléculaires basées sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) ou la PCR en temps réel (Thompson *et al.* 2004).

L'avantage des méthodes histologiques est qu'elles permettent à la fois de localiser finement l'agent bactérien et de visualiser ses effets sur les tissus et structures de l'hôte. Les limites de ces méthodes viennent de leur lourdeur, et de la nécessité de disposer d'anticorps pour l'identification formelle par immuno-histochimie. Récemment, des bandelettes immuno-

chromatographiques ont été développées afin de détecter, directement et rapidement, les souches de *V. harveyi* pathogènes de crevettes dans les élevages (Sithigorngul *et al.* 2007). Cette méthode, modérément sensible (10^6 bactéries/ml, et jusqu'à 1-10 bactéries/ml après 6h d'enrichissement) repose une fois de plus sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques des souches de *V. harveyi* pathogènes pour la crevette.

La bactériologie permet, quant à elle, de quantifier l'ensemble des bactéries dans des individus sains ou infectés, et d'isoler des souches (lorsque celles-ci sont cultivables). Son principal avantage réside dans le fait qu'elle peut être suivie de méthodes d'identifications moléculaires pour valider la nature des souches isolées. Elle s'appuie sur l'existence de milieux sélectifs, comme par exemple le TCBS, milieu sélectif pour les vibrions, les milieux sélectifs pour *V. vulnificus* (Cerde-Cuellar *et al.* 2001; Warner & Oliver 2007) ou pour *V. harveyi* (milieu VhA) (Harris *et al.* 1996). Ce dernier est basé sur un pH et une concentration en NaCl élevés (pH 9, NaCl 30g/L), la présence de cellobiose et d'ornithine, d'indicateurs pHmétriques, et une incubation à 28°C.

La bactériologie peut être suivie d'analyses biochimiques, comme celles permises par les galeries API20E ou BIOLOG, mais dont les limites ont déjà été discutées dans les premiers paragraphes de cette partie dédiée aux bactéries du genre *Vibrio* (p64). Par contre, elle permet l'isolement de souches, et peut être suivie d'étape d'identification. La bactériologie peut également être complétée par l'utilisation de sondes nucléiques après transfert des colonies sur filtre (ou 'colony blot') comme cela a été développé sur la base des séquences de l'ARNr 16s (Raghunath *et al.* 2007).

Les méthodes moléculaires comme la PCR permettent de déterminer la présence ou l'absence d'un pathogène ou de confirmer une identification. De très nombreuses amorces sont disponibles dans la littérature, spécifiques d'une espèce, d'un genre ou d'une souche. Pour *V. harveyi*, des amorces basées sur la séquences de gènes comme *toxR* (Conejero & Hedreyda 2003; Pang *et al.* 2006) ou l'hémolysine *vvh* (Conejero & Hedreyda 2004) ont été développées et permettent de la différencier des espèces phylogénétiquement les plus proches (*V. alginolyticus*, *V. campbelli* ou *V. rotiferianus*).

Pour une identification au rang de souches (souches pathogènes ou non), seules des approches types RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou RAPD (Randomn Amplification of Polymorphic DNA) permettent de trancher (exceptions faites des souches

pour lesquelles les facteurs de virulence sont clairement identifiés). La RAPD, basée sur une amplification aléatoire de l'ADN génomique par l'ajout d'amorces de petites tailles, a déjà permis de définir des profils d'amplification associés à des souches virulentes de *V. harveyi* (Hernandez & Olmos 2004).

La PCR en temps réel permet non seulement l'identification de bactéries, mais également leur quantification. Toute la difficulté réside dans la mise au point des techniques d'extraction de l'ADN, et dans le choix des amorces. Cependant, une telle technique n'est actuellement disponible que pour des pathogènes humains comme *V. vulnificus* (Campbell & Wright 2003; Takahashi *et al.* 2005), et certains pathogènes d'invertébrés (Saulnier 2007; Fukui & Sawabe 2008).

Récemment, le développement de souches de vibrions marquées par une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein ou GFP) a permis de suivre les processus de pénétration et d'établissement bactériens par des techniques microscopiques (O'Toole *et al.* 2004; Sawabe *et al.* 2006; Drake *et al.* 2007).

2.6. Vibriophages et plasmides

En plus de leurs deux chromosomes, les souches du genre *Vibrio* peuvent contenir un ou plusieurs plasmides ou phages, de taille très variables, allant de 2,2 kb pour le plasmide pVCG4.1 porté par *V. cholerae* à 89 kb pour pVIBHAR, un plasmide porté par *V. harveyi*. A l'heure actuelle, 27 plasmides (présentés dans le [Tableau 4](#)) et 17 phages de vibrions sont séquencés.

Les plasmides sont des éléments d'ADN généralement circulaires et double brin, qui se maintiennent dans les bactéries, se répliquent de façon autonome, mais synchronisée avec la bactérie, et se transmettent entre les bactéries par conjugaison par l'intermédiaire de pili sexuels. Leur présence n'est à priori pas nécessaire à la survie de leur cellule hôte, bien qu'ils puissent porter des gènes codant pour des fonctions apportant des avantages évolutifs, comme la résistance à un poison, la synthèse d'un élément essentiel non disponible dans le milieu.

Les bactériophages ou virus de bactéries sont des entités composées d'une enveloppe protéique externe et d'ARN ou d'ADN simple ou double brin, linéaires ou circulaires. Les phages persistent sous deux états : en tant que phage virulent (qui se réplique dans une cellule bactérienne) ou sous forme lysogène (inséré dans le génome sous la forme d'un prophage). Comme tous les virus, ils se caractérisent par un parasitisme intracellulaire obligatoire.

L'identification de l'appartenance à la classe plasmide ou phage n'est pas toujours aisée, l'induction de plages de lyse phagiques n'étant pas toujours facilement observable (les phages tempérés ou pseudolysogéniques).

L'élément mosaïque R391, porteur de résistance aux antibiotiques et au mercure, a ainsi longtemps été considéré comme un plasmide jusqu'à ce qu'il soit démontré qu'il pouvait s'intégrer au génome bactérien en employant un mécanisme d'intégration proche de celui utilisé par les éléments CTX du phage de *V. cholerae* (Boltner *et al.* 2002). Il s'avère que cet élément est un composite de phage (pas d'origine de répllication plasmidique, présence d'intégrases phagiques, forme intégrée décrite) et de plasmide (gènes de résistance aux antibiotiques homologues à ceux portés par le plasmide R27 de *S. enterica*; transférable par conjugaison) (Boltner *et al.* 2002).

Plasmides

Les tous premiers plasmides et phages ont été isolés chez *V. cholerae* ou *V. anguillarum* dans les années 1960-70 et leur implication dans l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques ou de gènes de virulence a été démontrée dès les années 1970-80 (Crosa *et al.* 1977; Crosa 1980). Des études rapportent aussi des corrélations entre la résistance à l'ampicilline ou à la carbénicilline de certaines souches du genre *Vibrio* isolées du milieu naturel (en moyenne 60 à 70% de souches résistantes) et des profils plasmidiques (Li *et al.* 1999; Molina-Aja *et al.* 2002) : ces souches de *Vibrio* sp. peuvent ainsi contenir entre 1 et 4 plasmides de 9 à 123 kb (Li *et al.* 1999) et jusqu'à 11 profils plasmidiques ont pu être décrits (Molina-Aja *et al.* 2002).

Cependant, comme le suggèrent Hazen et ses collaborateurs (2007), il est à regretter que toutes les revues actuelles focalisent sur les phages de vibrions et non sur leur plasmides, rendant difficile l'établissement d'une liste exhaustive des plasmides de vibrions, certains isolés dès les années 1960, et certains pour lesquels l'espèce hôte n'a pas toujours été décrite (Molina-Aja *et al.* 2002). Nous nous contenterons donc d'établir la liste des plasmides actuellement séquencés (Tableau 4). A l'heure actuelle, seuls certains de ces plasmides ont été impliqués dans la virulence des vibrions.

Chez *V. vulnificus*, le plasmide pR99 a été fortement impliqué dans la virulence des souches, et en particulier dans la phase de colonisation. En effet, une souche curée (dont on a

enlevé le plasmide) n'est plus pathogène par balnéation, même si elle le reste par injection. Par contre, une complémentation (réinsertion du plasmide) de la souche curée restaure la virulence par balnéation (Lee *et al.* 2008). Ce plasmide code pour différents facteurs dont des toxines de type RTX et une métalloprotéase Vvp qui sera détaillée plus loin (paragraphe 2.7.2, p 95). Il confère également aux souches leur résistance au sérum et à la phagocytose (Valiente *et al.* 2008b).

Pour les souches de *Vibrio* non pathogènes de l'Homme, le plasmide le plus décrit a été isolé chez *V. anguillarum*, pJM1 de 65 kb (Di Lorenzo *et al.* 2003). Des expériences de curage ont permis de prouver formellement son implication (Crosa *et al.* 1977; Crosa *et al.* 1980). Ce plasmide a ainsi pu être associé à la virulence des souches de *V. anguillarum*, grâce à son système de capture du fer (Crosa 1980). Depuis, des variants de ce plasmide, ou pJM1-like, ont été rapportés dans diverses souches de *V. anguillarum* (Bay *et al.* 2007), montrant que les plasmides et l'information génétique doivent être considérées au rang des souches et non des espèces.

Chez *V. nigripulchritudo*, une corrélation entre la présence d'un petit plasmide de 11,2 kb et le niveau de virulence des souches a pu être démontrée (Reynaud *et al.* 2008). De façon intrigante, ce plasmide présente de fortes similitudes avec un plasmide de *V. shiloi*, pathogène de corail, jusque là, non impliqué dans la virulence de cette bactérie.

Chez *V. tapetis*, un large plasmide conjugatif, véritable mosaïque d'autres plasmides, a été récemment séquencé. Ce plasmide n'a pas pu être directement impliqué dans la virulence, de par l'échec des essais de curage, prouvant l'importance de ce mégaplasmide pour la bactérie, et très peu de séquences connues pour être impliquées dans la virulence ont pu être identifiées, résultat à nuancer par le fait que 48% des protéines codées n'ont pas de fonction connue (Erauso *et al.* Soumis).

Enfin, chez *V. harveyi*, plusieurs plasmides ont été décrits, souvent associés à des résistances antibiotiques (Teo *et al.* 2000), mais à ce jour, aucun n'a été formellement impliqué dans la virulence. Le plasmide pVIBHAR de *V. harveyi* est actuellement séquencé (juin 2008), et même si deux autres souches de *V. harveyi* sont en cours de séquençage et d'assemblage, aucune information sur la présence d'un éventuel plasmide dans ces souches n'est pour l'instant accessible.

Tableau 4 : Plasmides de vibrions séquencés à l'heure actuelle.

Le nom et la taille des plasmides, l'espèce de *Vibrio* à partir de laquelle ils ont été extraits et les auteurs des séquences sont indiqués dans le tableau.

<i>Vibrio</i>	Nom du plasmide	Taille du plasmide	Numéro accession Genbank	Auteurs
<i>V. anguillarum</i>	pJM1	65,0	NC_005250	Di Lorenzo <i>et al.</i> , 2003
<i>V. anguillarum</i>	pEIB1	66,2	AY255699	Wu <i>et al.</i> , 2003
<i>V. cholerae</i>	pVCG4.1	2,2	NC_010910	Zhang and Gu, unpublished
<i>V. cholerae</i>	pVCG1.2	2,4	NC_010899	Zhang and Gu, unpublished
<i>V. cholerae</i>	pVCG1.1	4,4	NC_010897	Zhang and Gu, unpublished
<i>V. cholerae</i>	pTLC	4,7	NC_004982	Rubin <i>et al.</i> , 1998
<i>V. cholerae</i>	pSIO1	4,9	NC_006860	Purdy <i>et al.</i> , unpublished
<i>V. fischeri</i>	pES213	5,5	AY465897	Dunn <i>et al.</i> , 2005
<i>V. fischeri</i>	pES100	45,8	NC_006842	Ruby <i>et al.</i> , 2005
<i>V. harveyi</i>	pVIBHAR	89,0	NC_009777	Bassler <i>et al.</i> , unpublished
<i>V. nigrripulchritudo</i>	pSFn1	11,2	NC_010733	Reynaud <i>et al.</i> , 2008
<i>V. parahaemolyticus</i>	pSA19	4,8	NC_00208	Iwasaki <i>et al.</i> , unpublished
<i>V. parahaemolyticus</i>	pO3K6	8,8	NC_002473	Nasu <i>et al.</i> , 2000
<i>V. salmonicida</i>	pVS43	4,3	NC_006859	Hjerde <i>et al.</i> , unpublished
<i>V. salmonicida</i>	pVS54	5,3	NC_006858	Hjerde <i>et al.</i> , unpublished
<i>V. shiloi</i>	pAK1	13,4	NC_010734	Reynaud <i>et al.</i> , 2008
<i>V. splendidus</i>	pPS41	6,9	AF149757	Powers <i>et al.</i> , 2000
<i>V. tapetis</i>	pVT1	82,2	NC_010614	Erauso <i>et al.</i> , unpublished
<i>V. vulnificus</i>	pMP-1	7,6	DQ288663	Zhang and Gu, unpublished
<i>V. vulnificus</i>	pYJ016	48,5	NC_005128	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>V. vulnificus</i>	pC4602-1	56,6	NC_009702	Lee <i>et al.</i> , 2008
<i>V. vulnificus</i>	pC4602-2	66,9	NC_009703	Lee <i>et al.</i> , 2008
<i>V. vulnificus</i>	pR99	68,4	NC_009701	Lee <i>et al.</i> , 2008
<i>Vibrio</i> sp.	pTC68	7,8	NC_008690	Furushita <i>et al.</i> , unpublished
<i>Vibrio</i> sp.	p09022A	31,0	NC_010114	Hazen <i>et al.</i> , 2007
<i>Vibrio</i> sp.	p23023	52,6	NC_010112	Hazen <i>et al.</i> , 2007
<i>Vibrio</i> sp.	pPS41	6,9	NC_004961	Sobecky <i>et al.</i> , 1998
<i>Vibrio</i> sp.	p0908	81,4	NC_010113	Hazen <i>et al.</i> , 2007

Phages

Les vibriophages à l'heure actuelle identifiés sont des bactériophages à ADN double brin non enveloppés : des *Podoviridae* (phages à queue courte et non-contractile) ou des *Myoviridae* (phages à queue longue et contractile) et *Siphoviridae* (phages à queue longue et flexible mais non-contractile). Une dizaine de phages filamenteux (famille *Inoviridae* ou non classés) ont également été décrits, amenant en Décembre 2002 à près de 200 vibriophages décrits (Kapfhammer *et al.* 2002). Seuls les principaux phages décrits seront ici présentés.

Le vibriophage le plus connu est sans aucun doute, le phage filamenteux CTX Φ de *V. cholerae* qui code pour la toxine cholérique (CT) (décrite plus bas dans le paragraphe 2.8, p 99), principal facteur de virulence de ce *Vibrio*. Ce phage a été isolé de souches virulentes de *V. cholerae*, et sa transmission dans des souches non-virulentes mais ayant préalablement acquis l'îlot de pathogénicité VPI (contenant le gène codant pour la protéine TCP ou toxin co-regulated pilus, nécessaire à l'entrée de CTX Φ) suffit à transmettre la toxicité des souches (Reidl & Klose 2002).

Dans les souches contemporaines ou biotype El Tor, le phage CTX Φ est intégré au chromosome I de *V. Cholerae*, à proximité du phage filamenteux RS1, véritable 'satellite' de CTX Φ . Le phage CTX Φ a un mode de répllication original qui passe par un prophage extra-chromosomique, sans excision du phage. Ce processus repose sur la présence de tandems chromosomiques répétés CTX Φ -CTX Φ ou CTX Φ -RS1, et permet aux souches contemporaines une transmission à la fois verticale et horizontale (Davis & Waldor 2003). Ce phage est également original car il ne détruit pas sa bactérie hôte pendant sa phase lytique et n'altère pas la croissance de son hôte. Ainsi, la manière dont la biologie de CTX Φ est entremêlée avec celle de *V. cholerae* est remarquable, puisque le phage utilise les fonctions de son hôte sans compromettre la physiologie de ce dernier, et en lui amenant des avantages évolutifs, comme sa multiplication au sein du corps humain et sa dissémination par la propagation du choléra (McLeod *et al.* 2005).

V. parahaemolyticus est la seconde bactérie pathogène pour l'Homme infectée par de nombreux phages, dont au moins 8 sont séquencés. *Podoviridae* ou phages non classés, ces virus à ADN ont un génome entre 8 kb (Vf33) et 49.6 kb (VP16T). Ces phages ont souvent été isolés à partir de populations bactériennes contenues dans des échantillons d'huîtres ou d'eau de mer, contenant de nombreuses souches bactériennes (DePaola *et al.* 2003; Valiente *et al.* 2008b). Plusieurs études ont montré que les mêmes phages (nommés VpV pour *V. parahaemolyticus* virus) pouvaient infecter ces diverses souches de *Vibrio* (dont *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. natriegens* et *V. vulnificus*). Ces dernières pourraient ainsi participer à la persistance des phages pendant l'hiver quand *V. parahaemolyticus* n'est plus détectable (Comeau *et al.* 2005). Plus de 13 VpVs ont été isolés dans cette étude et entre $0,5 \cdot 10^4$ et $1,1 \cdot 10^5$ virus.cm⁻³ ont pu être quantifiés dans les huîtres tout au long de l'année (Comeau *et al.* 2005).

V. harveyi est également connu pour ses phages, capables de lui conférer sa virulence. Ses deux principaux phages sont VHML (*Vibrio harveyi* myovirus-like) et VHS1 (*Vibrio harveyi* siphovirus-like).

L'importance de **VHML** dans la pathogénicité de *V. harveyi* a été prouvée en comparant les mortalités induites par l'injection dans des saumons de souches de *V. harveyi* vierges de phage et de ces mêmes souches infectées par VHML (Oakey & Owens 2000; Austin *et al.* 2003; Munro *et al.* 2003). Certaines souches n'induisant aucune mortalité seules, ont entraîné dans cette expérience entre 80 à 100% de mortalités en 14 jours. Ces résultats ont été confirmés en suivant les mortalités induites par la balnéation d'*Artemia nauplii* par ces mêmes souches (Austin *et al.* 2003). Cette nouvelle virulence est certainement à lier à la production de nouvelles protéines extra-cellulaires et de plus hauts niveaux d'activité hémolytiques (Vidgen *et al.* 2006).

VHML est un phage à ADN à queue rétractile (Figure 23) de 43,2 kb, contenant 57 ORFs putatives, 37 ORFs ayant des homologues nucléotidiques et 28 correspondant à des gènes pouvant être associés à des fonctions protéiques. Parmi ces gènes, des gènes de structure, des gènes associés à l'intégration (basée sur des séquences inversement répétées de 33 pb aux extrémités du génome de VHML), et des gènes potentiellement associés à la virulence ont pu être annotés (Oakey *et al.* 2002). Ainsi, Oakey et ses collaborateurs ont identifié une protéine Dam (DNA adenine methyl transferase), qui est un régulateur transcriptionnel (jouant sur l'affinité des protéines régulatrices pour l'ADN) impliqué dans le contrôle des facteurs de colonisation d'*E. coli* ou des facteurs de virulence de *V. cholerae*

(Oakey *et al.* 2002). Enfin, ils ont rapporté une putative protéine ADPRT (ADP-ribosylating toxin) connue pour agir comme neurotoxine.

Le vibriophage VHML ne peut être transmis qu'à certaines souches de *Vibrio* : d'autres souches de *V. harveyi* et *V. alginolyticus* (6 au total sur les 36 testées par les auteurs) (Oakey & Owens 2000). Cette préférence pour les souches de *V. harveyi* ainsi que sa capacité à infecter d'autres vibrions a été confirmé ultérieurement (Payne *et al.* 2004).

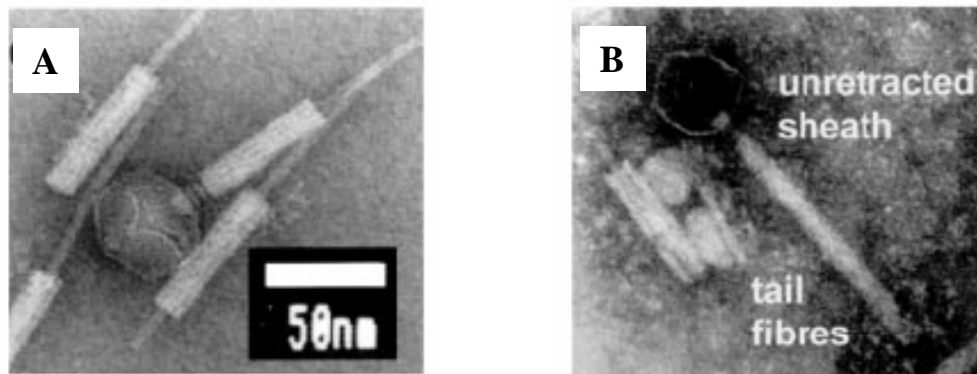


Figure 23 : Phage VHML (selon Oakey *et al.* 2000)

VHML queue rétractée (A) ou non-rétractée (B). Echelle 50 nm.

Le phage **VHS1** (83 kb, Figure 24) est un phage lytique isolé à partir de prélèvement d'eau d'élevage de crevettes. Ce vibriophage contient entre autre un transposon rendant les souches résistantes à l'ampicilline et aux autres β -lactames (Pasharawipas *et al.* 2005). Des études préliminaires tendent à prouver que ce phage augmenterait la virulence des souches de *V. harveyi* envers les crevettes, par la synthèse de nouvelles protéines excrétées (Puiprom 2003).

L'étude de ce phage, capable de former de claires plages de lyses pendant sa phase lytique (Figure 24), a permis de démontrer l'importance de la physiologie bactérienne dans l'infection phagique et dans la succession de phases lysogéniques ou lytiques. Ainsi, des bactéries maintenues en eau de mer pendant 1 h sont sensibles à l'infection phagique, et les phages qu'elles contiennent entrent en phase lytique. Les auteurs proposent un mode de transmission *via* un récepteur reconnaissant le phage, potentiellement inductible (Pasharawipas *et al.* 2008).

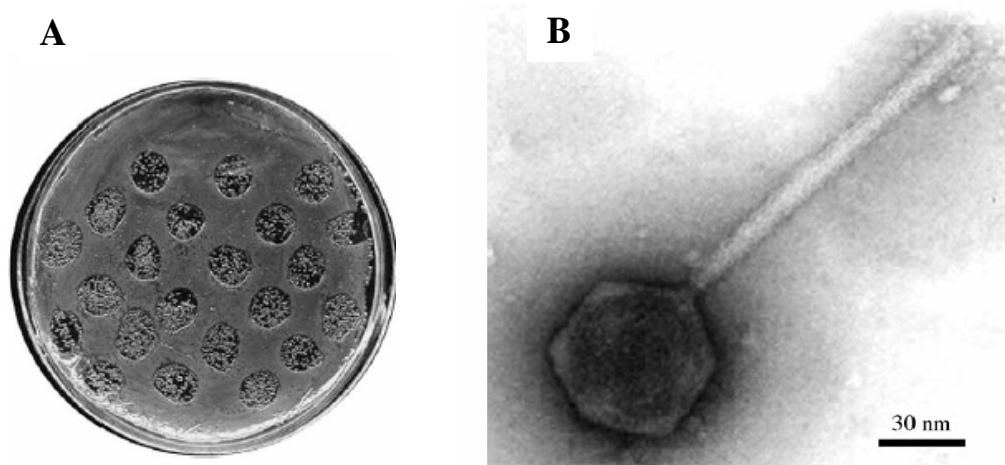


Figure 24 : Phage VHS1 (selon Pasharawipas *et al.*, 2005)

(A) Plages de lyses induites par le phage lytique VHS1 (B) VHS1 observé en microscopie électronique à transmission.

D'autres phages ont pu être isolés d'échantillons naturels contenant de nombreuses souches de *V. harveyi* (7 phages isolés et 42 souches de *V. harveyi* sur 100 échantillons testés). Six de ces phages sont issus d'échantillons venant d'écloseries de crevettes, suggérant que cet environnement riche en *V. harveyi* serait propice au développement de phages (Shivu *et al.* 2007).

A l'inverse des phages de *V. harveyi* qui ont un spectre d'hôtes restreint, certains phages comme le phage KVP40, originellement isolé chez *V. parahaemolyticus* peuvent infecter de très nombreux hôtes tels que *V. cholerae*, *V. natriegens*, ou *Photobacterium leiognathi* (Miller *et al.* 2003).

De façon plus générale, les phages sont impliqués dans le contrôle de la virulence bactérienne, par la production de toxines, de protéines impliquées dans la colonisation et dans la résistance aux molécules de défense eucaryotes. Ainsi, le phage CTX Φ contient des gènes comme le gène *ctxAB* codant pour la toxine cholérique, le gène *tcp* codant pour un pilus de type IV, essentiel à la colonisation intestinale de *V. cholerae* (McLeod *et al.* 2005) (décrit plus bas dans le paragraphe 2.7.1, p91). Ils peuvent influencer la résistance bactérienne au sérum et à la phagocytose (Wagner & Waldor 2002), et enfin, favoriser la transmission de leur bactérie hôte, comme le fait CTX Φ *via* la toxine cholérique qui sur-active l'activité adénylate cyclase des entérocytes, induisant des diarrhées aqueuses, et ainsi la transmission oro-fécale de *V. cholerae* chez l'homme (Wagner & Waldor 2002).

Quelques exemples de facteurs de virulence présents chez les vibrions seront illustrés ci-dessous (quel que soit le support génétique, chromosome, plasmide ou phage). Mais par virulence, il ne faut pas seulement entendre toxine, les facteurs de virulence étant un ensemble de facteurs permettant à la bactérie de coloniser son hôte, de se multiplier en son sein, de se maintenir malgré le système immunitaire de l'hôte, et enfin de produire des toxines.

2.7. Facteurs de virulence : Pouvoir de colonisation et de multiplication

2.7.1 Colonisation de l'hôte et adhérence

Flagelle

Les flagelles sont des organelles complexes permettant aux bactéries de nager (jusqu'à 60 $\mu\text{m/s}$ (McCarter 2001)) et leur conférant ainsi la mobilité nécessaire à l'accession au site d'infection. Ces organelles sont bien conservées chez les vibrions, comme l'illustre la forte conservation des flagellines, les protéines constitutrices du flagelle. La synthèse de flagelle et la motilité sont des processus coûteux en énergie, estimés à 2% de l'énergie totale d'*E. coli* (Pallen & Matzke 2006).

Le flagelle est constitué d'un corps basal composé de plusieurs anneaux, ancré dans les membranes bactériennes, et de deux structures axiales, le filament et le crochet (Figure 25) (Pallen & Matzke 2006). Le filament flagellaire est une structure tubulaire pouvant mesurer environ 15 μm , suite à l'assemblage de près de 30 000 sous-unités de flagellines (protéine FliC). Ce filament contient 11 protofilaments qui délimitent un canal interne par lequel le système de sécrétion de type III peut véhiculer des protéines depuis la base du flagelle, de façon dépendante de l'ATP (Beatson *et al.* 2006).

Plusieurs types de flagelles sont décrits chez les vibrions. *V. parahaemolyticus* a, par exemple, 2 types de flagelles : un polaire et un latéral. Les flagelles polaires sont constitutivement exprimés (mobilité type 'swimming'), alors que les flagelles latéraux sont induits par des surfaces solides ou visqueuses (mobilité type 'swarming'). Dans son génome, les 60 gènes de la synthèse du flagelle polaire sont sur le chromosome 1, alors que ceux codant pour le flagelle latéral sont sur le chromosome 2, suggérant à nouveau que le chromosome 2 contient les gènes nécessaires à l'adaptation des bactéries (Makino *et al.* 2003)

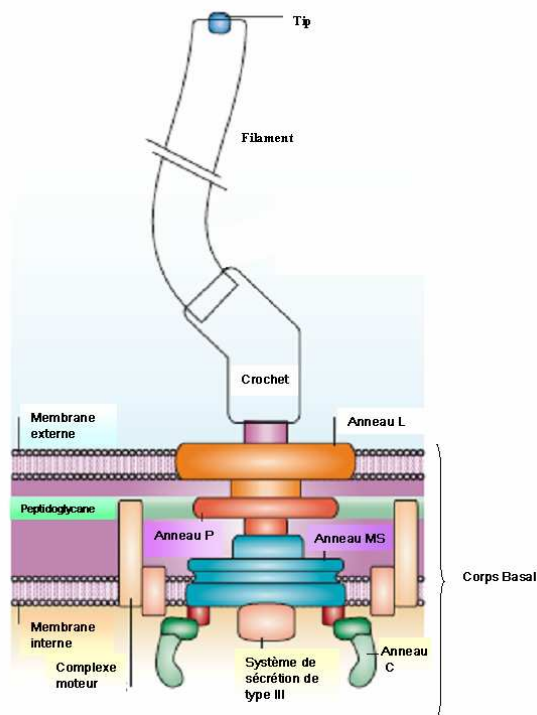


Figure 25 : Flagelle de bactérie à Gram-négative (adapté de Pallen et Matz, 2007)

L'activité flagellaire est couplée à la machinerie du chimiotactisme, qui détecte des informations chimiques et physiques de l'environnement, et orchestre la migration dans un but de croissance et de survie bactérienne (recherche de nutriments ou fuite de substances toxiques par exemple) (Ramos *et al.* 2004). Mais ce flagelle, et les flagellines en particulier, seraient également responsables de la réponse pro-inflammatoire induite par les bactéries, et de l'activation du système immunitaire de l'hôte, *via* les récepteurs Toll-like TLR5 et les voies NFκB ou MAP-Kinases (Ramos *et al.* 2004).

Les flagelles confèrent la mobilité aux vibriens, nécessaire à la colonisation intestinale de *V. cholerae*, à l'association branchiale de *V. anguillarum*. Le mucus intestinal semble jouer un rôle particulier dans ces associations, un rôle de chimio-attractant (O'Toole *et al.* 1999), mais également un rôle d'inducteur. Une analyse protéomique comparative d'une souche de *V. salmonicida* a permis de démontrer l'induction, en présence de mucus, de protéines impliquées dans la synthèse du flagelle, FlaC, FlaD et FlaE (Uttakleiv Ræder *et al.* 2007). Ces protéines ont la propriété de polymériser pour former les filaments du flagelle, même si elles ne peuvent pas en induire la formation, seules. L'implication de FlaD et FlaE dans la virulence a été démontrée expérimentalement : leur délétion réduit la virulence *in vivo* de

V. salmonicida (testée par balnéation) (McGee *et al.* 1996). Ainsi, chimiotactisme, synthèse du flagelle et motilité bactérienne sont étroitement liés. De multiples régulateurs interviennent à ce niveau, souvent associés à des voies de communication bactériennes (Jaques & McCarter 2006) et seront décrits plus bas, dans le paragraphe dédié (paragraphe 2.10, p 104).

V. harveyi possède également un flagelle polaire, qui a pu être observé en microscopie électronique à transmission (Figure 26).

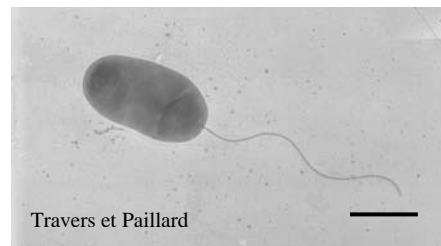


Figure 26 : *V. harveyi* souche ORM4 en microscopie électronique à transmission
Barre = 1 μ m.

Pili de type 4

Les pili (ou fimbriae) sont des appendices de surface plus courts et plus fins (6-7 nm de diamètre) que les flagelles, composés de sous-unités de pilines. Les pili sexuels (entre 1 et 4) participent au transfert de matériel génétique par conjugaison bactérienne. Les pili communs sont, quant à eux, des structures permettant la mobilité de type 'twitching' et la fixation des bactéries sur les surfaces de leur hôte, et entrent donc dans les facteurs de virulence. Les pili de type IV représentent les fimbriae les plus impliqués dans la virulence et les plus étudiés sont ceux présents chez *V. cholerae*.

Le TCP est un facteur de colonisation intestinal essentiel chez *V. cholerae*. Il est codé par le cluster de gènes *tcp* contenant au moins 15 ORFs, dont celui codant pour TapA, la sous-unité principale du TCP, qui forme des paquets de filaments à la surface de la bactérie (Faruque *et al.* 2005). Ce pilus particulier est également un récepteur au phage CTX Φ , et permet l'entrée de ce phage, porteur de gènes de virulence comme celui codant pour la toxine cholérique.

L'hémagglutinine sensible au mannose (MSHA), initialement caractérisée comme une hémagglutinine, est en réalité un pilus de type 4. Elle n'est présente que dans le biotype El-Tor de *V. cholerae*, et son rôle précis dans la virulence, par la formation de biofilms, a été

discuté. En effet, elle serait requise pour la colonisation intestinale, et participerait à l'efficacité de colonisation. La protéine MSHA est codée par la plupart des génomes de vibrions séquencés (Makino *et al.* 2003) et a été impliquée dans l'adhérence au zooplancton (Reen *et al.* 2006).

V. vulnificus possède 8 gènes (sur son chromosome 1) codant pour la synthèse de pili de type IV, pouvant intervenir dans l'adhérence aux cellules de l'hôte et dans la motilité. Les protéines PilA, piline de type IV et PilD, pré-piline peptidase, ont été clairement impliquées dans la synthèse des pili, dans l'adhérence aux cellules épithéliales humaines, dans la formation de biofilms (Paranjpye & Strom 2005), mais également dans la colonisation et dans la persistance de *V. vulnificus* au sein des huîtres *C. virginica* (Paranjpye *et al.* 2007).

Biofilms

La plupart des bactéries dans des environnements oligotrophes poussent en biofilms plutôt que sous forme planctonique libre. Les biofilms, qui procurent une homéostasie et une stabilité dans cet environnement changeant, sont des agrégats de bactéries structurés en 3 dimensions, mixtes ou composés de cultures pures de micro-organismes enveloppées dans une matrice polysaccharidique qu'ils synthétisent. Ils permettent aux bactéries de coloniser de nouveaux habitats, mais jouent également un rôle important dans la persistance des vibrions (Reen *et al.* 2006). Matz et ses collaborateurs (2005) ont ainsi montré que les biofilms permettaient à *V. cholerae* de survivre au broutage des protozoaires, alors que sous forme libre, il était éliminé.

Les biofilms sont formés suite à l'attachement initial d'une bactérie (généralement médié par ses pili) (Shime-Hattori *et al.* 2006). S'en suit l'étape de production d'exopolysaccharides, aboutissant à l'entassement de bactéries pour former un biofilm mature (Figure 27). Les biofilms permettent l'accumulation de grandes quantités de bactéries sur une surface, allant jusqu'à 10^7 cellules/cm². Le développement des biofilms est un processus dynamique alternant croissance et détachement de cellules ou d'agrégats de cellules. Ce détachement, initialement supposé passif, serait en fait un processus actif, basé sur des variations phénotypiques du biofilm (Hall-Stoodley & Stoodley 2005).

Enfin, les biofilms sont connus pour être corégulés avec la virulence bactérienne par le biais du quorum-sensing, décrit dans le paragraphe 2.10, p104.

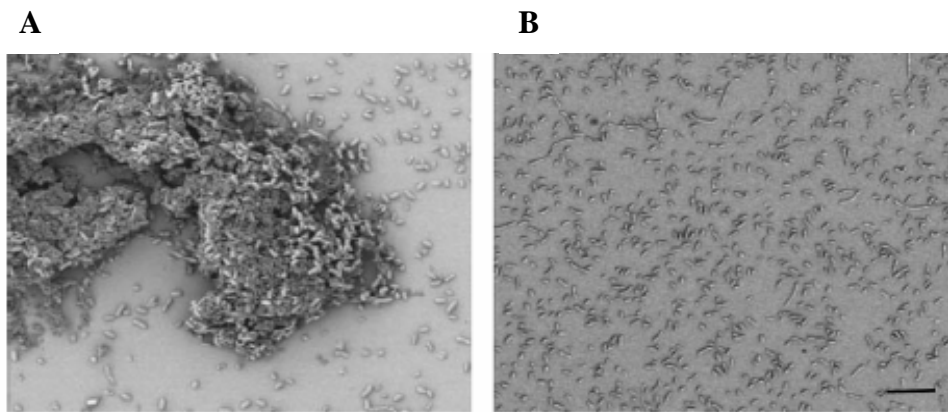


Figure 27 : Biofilms observés formés par *V. parahaemolyticus* (selon Shime-Hattori *et al.* 2006)

Observation en microscopie électronique à balayage de *V. parahaemolyticus* (A) sauvage ou muté, (B) déficient en Pila.

2.7.2 Multiplication dans les tissus de l'hôte

La capacité d'une bactérie à se multiplier dans les tissus de son hôte revient à sa capacité à pouvoir détourner des éléments qui sont essentiels à sa croissance (comme le fer) à transformer des éléments en source de carbone utilisable, mais également à envahir l'hôte. Dans ce paragraphe seront décrits les sidérophores permettant de détourner le fer, et les invasives, enzymes hydrolytiques permettant l'approvisionnement des bactéries en sources carbonées et la dégradation tissulaire nécessaire à sa multiplication/propagation.

Sidérophores

Le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes vivants, mais la majorité du fer présent dans les fluides biologiques chez les vertébrés et invertébrés est présent sous forme liée, à des protéines ou aux cellules sanguines. Les bactéries ont des besoins en fer très importants et elles ont développé des mécanismes permettant de s'approvisionner directement, les sidérophores, ou composés séquestrant le fer (Crosa & Walsh 2002).

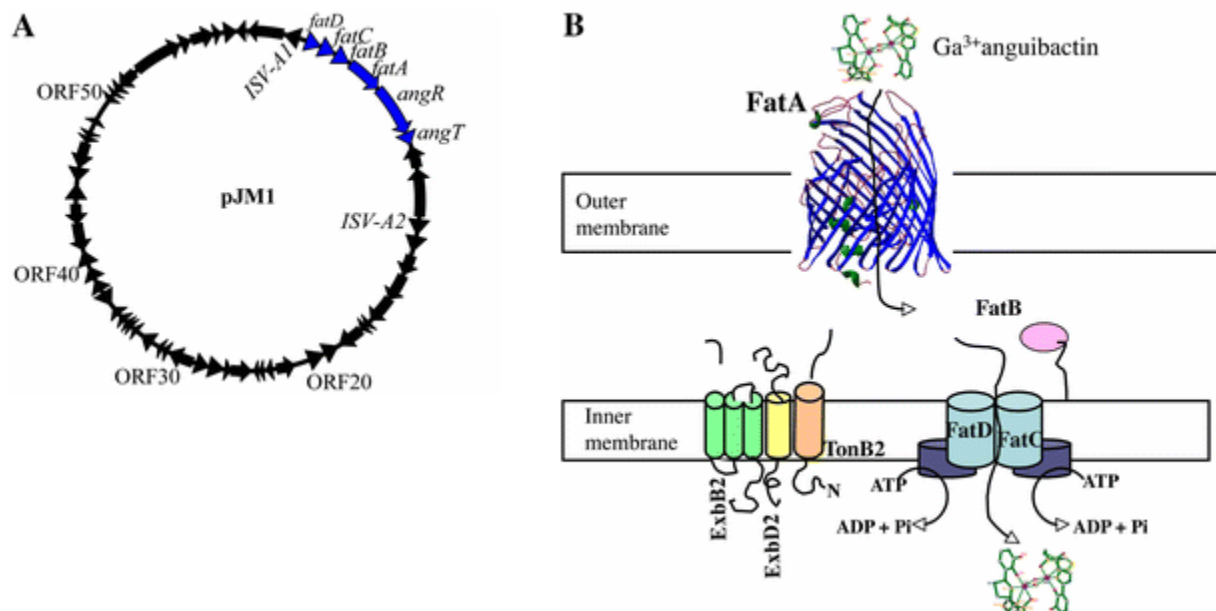
La connaissance des sidérophores s'est pendant longtemps axée sur leur répresseur universel, la protéine Fur, dénominateur commun de tous les systèmes de capture du fer, qui agissent de façon conjointe chez les bactéries. En condition de concentrations élevées en fer, le complexe Fe^{2+} -Fur se lie aux promoteurs contenant les séquences régulatrices de liaison à Fur ou 'Fur-box' et réprime la transcription. Les protéines Fur de *V. anguillarum*, *V. cholerae*, et *V. vulnificus* sont très proches, même si elles n'ont que 60% d'homologie avec les séquences d'*E. coli*. Mais la régulation des sidérophores passe aussi par des régulateurs

positifs (régulateurs de transcription) et des petits ARNs (régulateurs post-transcriptionnelle) (Crosa & Walsh 2002).

Les sidérophores (500 décrits environ) sont de petites molécules peptidiques, qui contiennent des chaînes latérales et des groupes fonctionnels leur conférant une forte affinité pour de nombreux ligands contenant des ions ferriques (Fe^{3+}). Ils peuvent chélater le fer ferrique libre, et peuvent aussi l'extraire de protéines porteuses.

Chez *V. anguillarum*, le système de captage du fer est basé sur l'anguibactine, et les gènes codants pour la régulation, la synthèse et le transport de ce sidérophore sont portés par le plasmide pJM1 de 65 kb, présenté dans la Figure 28. Comme chez les bactéries à Gram négatives, les complexes TonB (Stork *et al.* 2004) sont présents sur la membrane interne de ce vibron, et lui permettent d'exploiter les sidérophores produits par d'autres organismes, comme l'entérobactine, l'acinetobactine ou le ferrichrome (Crosa 1989; Dorsey *et al.* 2004).

Le système de transport médié par la vibriobactine est celui utilisé par *V. cholerae*, qui puise le fer dans l'hème ou l'hémoglobine. D'autres vibriions pathogènes produisent des sidérophores, comme *V. parahaemolyticus* (Yamamoto *et al.* 1994), *V. vulnificus* (Simpson & Oliver 1983), *V. fluvialis* (Yamamoto *et al.* 1993), *V. salmonicida* (Colquhoun & Sorum 2001) *V. harveyi* (Soto-Rodriguez *et al.* 2003).



Invasines

Les invasines sont des hydrolases qui agissent à de courte distance du siège de multiplication du pathogène, et n'induisent pas de lyse cellulaire. Ainsi, protéases, lipases, nucléases, hyaluronidases, collagénases font parties des nombreuses invasines recensées depuis une trentaine d'année chez les vibrions.

Nous pourrions citer les collagénases Vac (*V. alginolyticus*), ou VppC et PrtV (*V. parahaemolyticus*), ou VvpE (*V. vulnificus*) ou enfin la protéine Pap6 de *V. harveyi*, capable de dégrader gélatine, fibronectine et collagène (Teo *et al.* 2003).

Chez *V. harveyi*, une chitinase codée par le gène *chiA* a été identifiée dès 1988. Cette enzyme est capable de dégrader la chitine, polymère présent dans la composition du zooplancton, du phytoplancton et des crustacés. Elle lui permet de dégrader la chitine en oligosaccharides (diacetylchitobiose et *N*-acetylglucosamine) utilisables par la bactérie comme source carbonée, favorisant ainsi la colonisation de milieux riches en chitine (Suginta *et al.* 2000; Suginta *et al.* 2004)

Les autres protéines identifiées chez les bactéries du genre *Vibrio* pouvant être considérées comme des invasines sont des métalloprotéases, et peuvent être également considérées comme des toxines. Elles seront décrites dans le paragraphe dédié (paragraphe 2.8.1, p 99)

2.7.3 Interférence avec le système immunitaire de l'hôte

La survie bactérienne dépend également de sa capacité à échapper au système immunitaire de l'hôte, ou à l'inhiber.

Capsules

La capsule ou CPS (capsular polysaccharide) a été bien étudiée chez *V. vulnificus* bactérie souvent qualifiée d'hautelement invasive, de par son fort pouvoir multiplicateur (Reen *et al.* 2006). La CPS, qui recouvre entièrement *V. vulnificus*, permet à la bactérie de résister aux composés à forte activité bactéricide. La perte de la capacité à sécréter cette capsule s'accompagne d'une forte diminution de sa virulence (Wright *et al.* 1990). Il existe une variabilité dans les capsules de *V. vulnificus* au sein d'une souche et également selon les isolats (différentes compositions selon les isolats, certaines souches en seraient même dépourvues) (Wright *et al.* 1999).

Cette capsule confère ainsi au pathogène une variabilité antigénique, mais également une certaine résistance à la phagocytose et aux activités bactéricides du sérum (Strom & Paranjpye 2000; Chen *et al.* 2003).

Protection contre le stress oxydatif

Afin d'échapper aux molécules toxiques produites lors de la phagocytose, certains vibrions pathogènes de la palourde *R. philippinarum*, de la coquille Saint-Jacques *P. maximus* et de l'huître creuse *C. gigas* sont capables d'inhiber la production d'espèces oxygénées réactives (Lambert & Nicolas 1998; Lambert *et al.* 2003).

De façon classique, les bactéries sont capables de produire des enzymes de protection contre le stress oxydatif. Ces enzymes transforment les espèces oxygénées réactives hautement toxiques, produites par l'hôte, en molécules peu ou pas toxiques. La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme communément trouvée chez les vibrions. Chez *V. shiloi*, une SOD température dépendante, produite à 30°C mais pas à 16°C, a été impliquée dans la virulence bactérienne. Un mutant de *V. shiloi* SOD⁻ perd sa capacité de survie intra-cellulaire ; ainsi, il adhère aux cellules, pénètre dans celles-ci, se multiplie un peu puis meurt (Banin *et al.* 2003). La SOD apparaît dans ce cas nécessaire à la survie intracellulaire de ce pathogène.

Des souches de *V. harveyi*, pathogènes de crevettes, sont quant à elles capables d'induire la synthèse de deux SODs en réponse à un stress oxydatif (Vattanaviboon & Mongkolsuk 2001; Vattanaviboon *et al.* 2003).

L'augmentation de protéines impliquées dans la défense bactérienne à un stress oxydatif a également pu être démontrée par électrophorèse 2D en comparant des extraits protéiques de *V. salmonicida* obtenus à partir de cultures réalisées en présence ou en absence de mucus de saumon. Les spots correspondants à deux peroxydases (une Tpx-Grx lipide peroxydase et une peroxydase du système bactérien AhpC pour Alkyl hydroperoxidase reductase) sont d'intensité plus forte dans des extraits protéiques préparés à partir de souches cultivées en présence de mucus (Uttakleiv Ræder *et al.* 2007).

Répression des molécules antigéniques

Une dernière stratégie qui peut être employée par les vibrions afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte est le 'camouflage' des bactéries. En réprimant des molécules anti-géniques de surface, les vibrions peuvent éviter l'induction de la réponse immunitaire.

Hsiao et ses collaborateurs (2006) ont ainsi identifié l'importance du facteur MSHA et de sa répression au sein de l'hôte, pour la colonisation. En d'autres termes, l'induction de ce facteur est importante pour la colonisation de l'intestin, mais sa répression, sous le contrôle du régulateur transcriptionnel ToxT est également nécessaire pour éviter les immunoglobulines. Ainsi *V. cholerae* est capable de coordonner l'activation de gènes de virulence et leur répression dans les premiers temps de l'infection, afin d'éviter l'induction de la réponse immunitaire.

2.8. Facteurs de virulence : Pouvoir toxínogène

Deux grands types de toxines peuvent être produites par les bactéries à Gram négative : les exotoxines et les endotoxines. Les exotoxines sont des protéines, généralement thermolabiles, sécrétées par les bactéries, fortement antigéniques. Leur mode d'action est souvent spécifique (cytotoxines, entérotoxines) et elles sont hautement toxiques. A l'opposé, les endotoxines sont des lipopolysaccharides liées à la membrane externe de la paroi bactérienne et libérées lors de la lyse. Elles sont thermostables, faiblement antigéniques et ont un mode d'action diffus ainsi qu'une faible toxicité.

2.8.1 Exotoxines

Toxines ciblant la surface de la cellule cible

Toxines clivant des molécules de surface

De nombreuses enzymes et toxines, comme des métalloprotéases, des phospholipases ou cytolysines sont impliquées dans la dégradation tissulaire et aussi dans l'invasion bactérienne.

Récemment, une métalloprotéase à zinc, Vam (*V. aesturianus* metalloprotease), à été caractérisée dans les ECPs de *V. aesturianus*, et son implication comme facteur de virulence a été prouvé *in vivo* par l'utilisation d'ECPs de souches de *V. tasmaniensis* exprimant la protéine Vam (Labreuche 2006).

Le génome de *V. cholerae* contient le gène *hap*, codant pour une hémagglutinine protéase, qui est une métalloprotéase sécrétée pouvant attaquer les protéines impliquées dans les jonctions serrées liant les cellules épithéliales (Makino *et al.* 2003).

Chez *V. vulnificus*, le gène d'une cytolysine *vvhA*, d'une métalloprotéase *vvp* et d'une phospholipase *vpl* ont été trouvés sur le petit chromosome. Ces facteurs ne sont cependant pas les seules cytotoxines de *V. vulnificus*, puisque, malgré l'activité des protéines purifiées, des souches mutantes déficientes pour ces gènes restent hautement virulentes et invasives (Chen *et al.* 2003). Treize homologues de cytotoxines connues ont d'ailleurs été identifiés dans le génome de *V. vulnificus* (Chen *et al.* 2003). La métalloprotéase Vvp portée par le plasmide pR99 de *V. vulnificus* a été clairement impliquée dans la virulence de la souche pour les anguilles, mais pas dans la survie intra-phagocytaire des celles-ci, permet la fixation des bactéries aux surfaces branchiales (Chen *et al.* 2003; Valiente *et al.* 2008a; Valiente *et al.* 2008b).

Il a été établi que l'injection de certaines protéases produites par les vibrions pouvait engendrer des mortalités chez les invertébrés. Ainsi, l'injection d'une serine protéase produite par *V. alginolyticus* ou de cystéine protéases produites par *V. harveyi* engendre des mortalités chez la crevette (Lee *et al.* 1997; Liu *et al.* 1997; Chen *et al.* 1999; Liu & Lee 1999; Chen *et al.* 2000) (Aguirre-Guzman *et al.* 2004). De plus, la protéase produite par *V. harveyi* réduit la capacité d'agglutination de l'hémolymphe (Lee *et al.* 1999).

Toxines formant des pores

Les hémolysines, protéines capables d'induire la lyse des cellules sanguines, comptent parmi les exotoxines les plus répandues chez les vibrions.

L'hémolysine TDH (ou Thermostable Direct Haemolysin) de *V. parahaemolyticus* a été décrite comme le principal facteur de virulence de cette bactérie (Nishibuchi & Kaper 1990). Les gènes *tdh* sont sur le chromosome 2, compris dans un îlot de pathogénicité de 80 kb environ (Makino *et al.* 2003). C'est une protéine formant des pores qui contribue à

l'invasion de la bactérie (Reen *et al.* 2006), et qui modifie le cytosquelette des cellules et l'homéostasie du calcium (Fabbri *et al.* 1999).

Les protéines de la famille des RTX (Repeats in ToXin) font également parti des exotoxines formant des pores rencontrées chez les vibrions. Cette famille de toxines est caractérisée par la présence d'un motif répété de 9 acides aminés [Leu-X-Gly-Gly-X-(Asn/Asp)-Asp-X] dans la partie C-Terminale de la protéine et a été identifiée chez *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.* 2003), chez *V. cholerae* (Lin *et al.* 1999) et sur le plasmide pR99 de *V. vulnificus*, indispensable à la virulence de la souche. Ce gène est porté par le plasmide et par le chromosome de *V. vulnificus*, ce qui amène les auteurs à conclure que ce n'est pas le principal facteur de virulence porté par ce plasmide (Lee *et al.* 2008), même si les protéines RTX sont clairement reliées à la virulence bactérienne. Ces toxines induisent un arrondissement des cellules épithéliales humaines par une dépolymérisation des fibres d'actine (Lin *et al.* 1999; Fullner & Mekalanos 2000).

Toxines à cible intracellulaire

La toxine cholérique (CT) ou toxine AB est codée par le gène *ctxAB* localisé sur le chromosome 1, dans le génome intégré du phage CTX Φ . Cette protéine thermolabile fait 82,5kDa et est composée d'une sous-unité A (hétérodimère) et d'une sous-unité B (homopentamère). Elle induit l'activation constitutive de l'adénylate cyclase, ce qui entraîne une forte production d'AMP cyclique (Adénosine MonoPhosphate cyclique) dans la cellule, et par voie de conséquence l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle les canaux ioniques. Il s'en suit une sécrétion importante de chlorure et, par osmose, d'eau en direction de la lumière intestinale. C'est l'efflux massif de liquides et de sels minéraux qui est à la base de la diarrhée (Lencer & Tsai 2003; Lencer & Saslowsky 2005).

Toxines injectées

Six grands types de systèmes de sécrétions protéiques sont décrits chez les bactéries à Gram négatives, le dernier (système de sécrétion de type 6 ou SST VI) étant reconnu depuis 2006 seulement. Ces 6 systèmes permettent le transport de protéines depuis l'intérieur de la cellule bactérienne à travers son enveloppe et jusque dans le milieu extérieur. Les SST II et V requièrent généralement la présence d'un peptide signal N-Terminal pour la translocation, alors que les SST I, III, et généralement IV et VI peuvent sécréter une protéine sans aucun signal. Les SST I et V sont relativement simples, constitués de 2 ou 3 protéines, alors que les

SST II, III et IV sont des larges complexes multi-protéiques. Les systèmes III et IV (pilus décrits dans le paragraphe ‘Colonisation de l’hôte et adhérence’) sont surtout impliqués dans les interactions bactéries – cellules eucaryotes, et dans le transfert de molécules effectrices directement dans le cytosol eucaryote. Seuls ces deux systèmes seront décrits dans le cadre de ce manuscrit (SST IV décrit dans le paragraphe 2.7.1, p91).

Le SST III est un des systèmes de sécrétion les plus complexes, codé par une trentaine de gènes organisés en opéron (Makino *et al.* 2003), et regroupés dans des îlots de pathogénicité de 20 à 40 kb. Il permet l’injection de protéines directement dans les cellules que ce soient des protéines cytotoxiques ou des protéines régulatrices. C’est ainsi que *V. parahaemolyticus*, bactérie à stratégie intracellulaire, utilise le SST III pour injecter dans les macrophages la protéine effectrice VP1686 qui accélère le processus de phagocytose puis de mort cellulaire programmée ou apoptose (mécanisme nommé ‘eat-me-and-die’ par les auteurs) (Bhattacharjee *et al.* 2006; Bhattacharjee *et al.* 2008).

L’analyse du génome de *V. parahaemolyticus* a permis de montrer qu’il existe deux systèmes codés respectivement sur le chromosome 1 (TTSS-1, Type Three Secretion System-1) et sur le chromosome 2 (TTSS-2) (Reen *et al.* 2006). Chaque système permet la sécrétion de protéines différentes, le TTSS-1 étant impliqué *in vitro* dans la cytotoxicité médiée par des mécanismes d’apoptose (Ono *et al.* 2006), et le TTSS-2 dans l’accumulation de fluide au niveau intestinal menant à son entérotoxicité.

Ce système a également été isolé chez des souches de *V. cholerae* O139 ne possédant pas les facteurs majeurs de pathogénicité (toxine cholérique), et constituerait une stratégie alternative de virulence (Dziejman *et al.* 2005). Par ce système, *V. cholerae* peut injecter dans les cellules eucaryotes une protéine VopF, qui altère l’organisation de l’actine du cytosquelette et participe ainsi à la colonisation intestinale de la bactérie (Tam *et al.* 2007).

Le SST III (TTSS-1) décrit chez *V. parahaemolyticus* a été identifié chez *V. aerogenes*, *V. alginolyticus*, *V. tubiashii* et *V. harveyi* (Park *et al.* 2004), ce dernier ayant été préalablement identifié par Henke et Bassler (2004).

2.8.2 Endotoxines

Les endotoxines sont des toxines libérées lors de la lyse des bactéries, puisqu’elles font partie intégrante de leur paroi. La toxicité dépend en particulier de sa composition

chimique. La paroi endotoxinique des bactéries à Gram négatives ou LPS (lipopolysaccharides) est composée :

- de la chaîne O-spécifique : variable et constituée de séquences répétées de saccharides. C'est la plus externe des structures, et elle porte les déterminants antigéniques.
- du « core » ou partie centrale, formé de saccharide, à composition moins variable.
- du lipide A, partie proximale du LPS insérée dans la membrane externe. Cette partie hydrophobe est composée de glucosamines portant des chaînes aliphatiques (et une petite partie saccharidique qui lui confère sa solubilité), et est principalement responsable de la toxicité.

Le LPS de *V. cholerae* a de nombreuses activités endotoxiniques ; il est pyrogène (provoque de la fièvre), léthal pour les souris et a des effets mitogènes (Chatterjee & Chaudhuri 2006). Le lipide A, qui est une partie bien conservée chez les vibrions, est responsable de ces activités endotoxiniques, et peut induire pyrogénicité, mortalités des embryons de souris, hémorragies tumorales et inactivation du complément.

Le pouvoir pathogène du LPS de *V. vulnificus* a été démontré par des injections intraveineuses chez la souris aboutissant à la mort des animaux (McPherson *et al.* 1991).

Le LPS a ainsi des propriétés toxiques, mais il faut rappeler qu'il est également impliqué dans l'induction de la réponse immunitaire, dans l'adhésion des bactéries, dans l'entrée de certains phages (phage K139 de *V. cholerae*), dans la formation de biofilms et dans la formation de la capsule CPS (Pour revue Chatterjee & Chaudhuri 2006).

2.9. Facteurs de virulence : *V. harveyi*

Peu d'études sont réellement allouées à la description des mécanismes de virulence de *V. harveyi* (Pour revue Austin & Zhang 2006), et elles ne concernent que les souches pathogènes de poisson et de crevette. Seuls quelques facteurs de virulence ont été mis en évidence, mais la diversité d'isolats (origine géographique et hôte différents) et de facteurs de virulence associés ne permet pas de proposer un mécanisme général pour cette bactérie. La régulation de ces facteurs est généralement sous la dépendance du quorum-sensing, et sera décrite dans le paragraphe 2.10 (p104).

Sa capacité d'adhérence et de dégradation de la chitine par la sécrétion de nombreuses chitinases a été démontrée (Montgomery & Kirchman 1993; Svitil *et al.* 1997; Svitil &

Kirchman 1998). D'autres protéines de virulence de *V. harveyi* comme sa chitinase *chiA*, son invasine *pap6*, sa SOD ou sa cystéine protéase ont déjà été présentées dans ce manuscrit (p97 p98).

Les produits extracellulaires de *V. harveyi* semblent avoir un rôle important dans sa pathogénicité chez les crevettes ; en effet, seules les souches de *V. harveyi* virulentes pour la crevette possèdent de fortes activités protéolytiques, phospholipases, et hémolytiques (Liu *et al.* 1996a). De façon similaire, chez *Artemia franciscana*, une corrélation entre pathogénicité des souches de *V. harveyi* et production de protéases, phospholipases et sidérophores a été démontrée (Owens *et al.* 1996; Soto-Rodriguez *et al.* 2003). Chez le saumon, un des facteurs de virulence des souches pathogènes est une hémolysine (Zhang & Austin 2000), la souche la plus virulente de *V. harveyi* pour le saumon possédant deux gènes codant pour l'hémolysine, *vhhA* et *vhhB*.

Les différentes protéines excrétées, isolées de souches pathogènes pour la crevette ou le saumon, et potentiellement impliquées dans la virulence sont : trois protéases non identifiées (Fukasawa *et al.* 1988), une protéase de 22 kDa (Liu *et al.* 1997), deux exotoxines de poids moléculaire différent (Harries & Owens 1999), et une endotoxine potentielle (Montero & Austin 1999)

Enfin, un système de sécrétion de type III a été identifié chez *V. harveyi* ; il est codé par trois clusters de gènes qui sont transcrits sous la dépendance du quorum sensing. Ce système est fonctionnel et permet l'exportation de la protéine VopD (Henke & Bassler 2004).

Des essais pour lier phylogénie des souches et virulence ont été entrepris mais sans succès, et il a été conclu que *V. harveyi* est une bactérie diversifiée dont la virulence provient probablement principalement de facteurs acquis via des éléments génétiques mobiles, comme les plasmides, les phages ou les transposons (Austin & Zhang 2006).

2.10. Facteurs de virulence : Communication et régulation

2.10.1 Fonctionnement

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication bactérien qui passe par des molécules signal extracellulaires appelées autoinducteurs ou AIs. La réponse aux autoinducteurs permet aux bactéries de coordonner l'expression des gènes au niveau

populationnel, à l'image des organismes pluricellulaires. Cette communication est fonction de la densité cellulaire. En effet, lorsqu'une population bactérienne produisant des autoinducteurs s'accroît, la concentration de ces molécules extracellulaires en fait de même. A forte concentration, les autoinducteurs induisent des modifications intracellulaires qui se traduisent par le déclenchement de fonctions biologiques comme la sécrétion de facteurs de virulence, la formation de biofilms, la conjugaison ou encore la bioluminescence (Pour revues Bassler 1999, 2004)

Le quorum sensing est un système très complexe constitué d'au moins trois voies, classées selon le type d'autoinducteurs et de voies de détection impliqués (Figure 29). La communication bactérienne peut être intra-spécifique, c'est-à-dire basée sur des autoinducteurs et récepteurs spécifiques d'une espèce (deux premiers systèmes ici décrits), ou à la fois intra- et inter-spécifique, comme nous le verrons pour le troisième système originellement décrit chez *V. harveyi*.

Le premier système a été mis en évidence chez *V. fischeri* et serait conservé chez plus de 70 espèces de bactéries à Gram négatives. Il s'appuie sur la production d'acyl-homosérines lactone (acyl-HSL), variables selon la composition et la longueur de la chaîne d'acides gras, véritables phéromones détectées par un récepteur membranaire nommé LuxR. Elles sont produites suite à l'expression du gène *luxI* codant pour une HSL-synthase, elle-même induite par LuxR.

Le second système, caractéristique des bactéries à Gram positives repose sur la production d'oligopeptides autoinducteurs sécrétés via des transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) et détectés par un système à deux composants, basé sur des histidine kinases. Le système à deux composants passe par une étape d'autophosphorylation du récepteur, en réponse à la liaison des peptides, qui est transduite par la phosphorylation et donc l'activation d'une protéine régulatrice, capable d'activer ou de réprimer l'expression de gènes cibles.

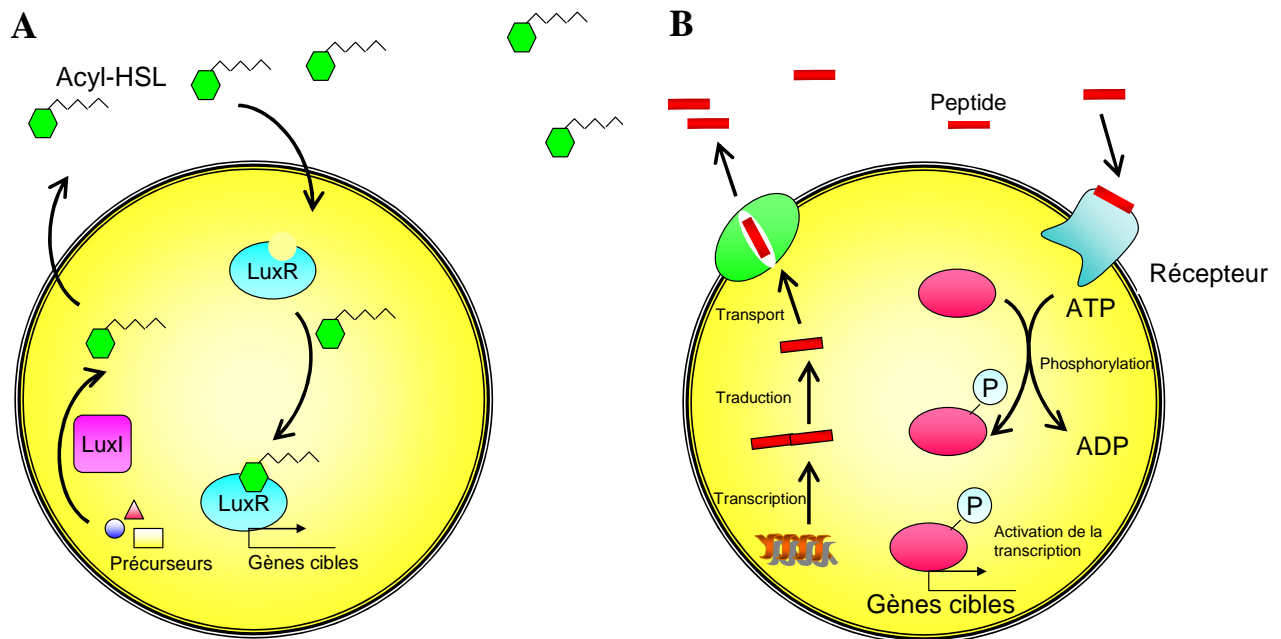


Figure 29: Systèmes 1 (A) et 2 (B) du quorum sensing (adapté de Turovskiy *et al.*, 2008)

(A) La synthèse d'acyl-HSL par LuxI est suivie, quand celui-ci atteint de fortes concentrations par sa reconnaissance par la protéine intracellulaire, LuxR, et par l'induction de gènes cibles. (B) La synthèse de peptides, exportés via des transporteurs membranaires est suivie, quand ceux-ci atteignent de fortes concentrations, par l'association à un récepteur membranaire qui transduit le signal menant à l'activation de la transcription de gènes cibles.

Le troisième système a été identifié chez *V. harveyi*. Il s'appuie sur trois autoinducteurs : AI-1, une homosérine lactone classique des bactéries Gram négatives synthétisée par le gène *luxM* et reconnu par la kinase LuxN ; et AI-2, un furanosyl borate diester synthétisé par le gène *luxS* et reconnu par la kinase LuxQ ; et enfin, le dernier autoinducteur identifié (mais dont la structure chimique n'est toujours pas connue), CAI-1 (Cholerae Autoinducer 1), passant par la voie Cqs ([Figure 30](#)).

La voie de l'AI-1 est définie comme une voie intra-spécifique, alors que les composants de la voie AI-2 sont très conservés entre les espèces, ce qui permet d'envisager des échanges inter-spécifiques. Ces échanges ont pu être mis en évidence suite à l'induction par le surnageant de culture d'une espèce de vibrions contenant l'AI-2, du QS chez d'autres vibrions.

A faibles concentrations, les protéines LuxN et LuxQ (récepteurs respectifs de AI-1 et AI-2) s'autophosphorylent, et sont à la base d'une cascade de phosphorylation qui converge à la phosphorylation de la protéine LuxU, puis de la protéine LuxO, qui interagit ainsi avec le

facteur σ^{54} . Ces derniers induisent alors la production d'ARN Qrr1-5 (Quorum regulatory RNAs) qui destabilisent l'ARN messager de LuxR (Tu & Bassler 2007), empêchant ainsi sa synthèse, et par voie de conséquence l'expression de l'opéron LuxCDABE (Figure 30).

A l'inverse, à fortes concentrations en autoinducteurs, AI-1 et AI-2 interagissent avec leurs récepteurs LuxN et LuxQ, empêchant la transduction de phosphorylations jusqu'à la protéine LuxO. Celle-ci étant sous forme inactive, non-phosphorylée, les ARNs messagers de LuxR sont traduits, et l'opéron LuxCDABE peut s'exprimer. Cet opéron contient des gènes codant pour des protéines impliquées dans la bioluminescence, et dans la virulence des bactéries.

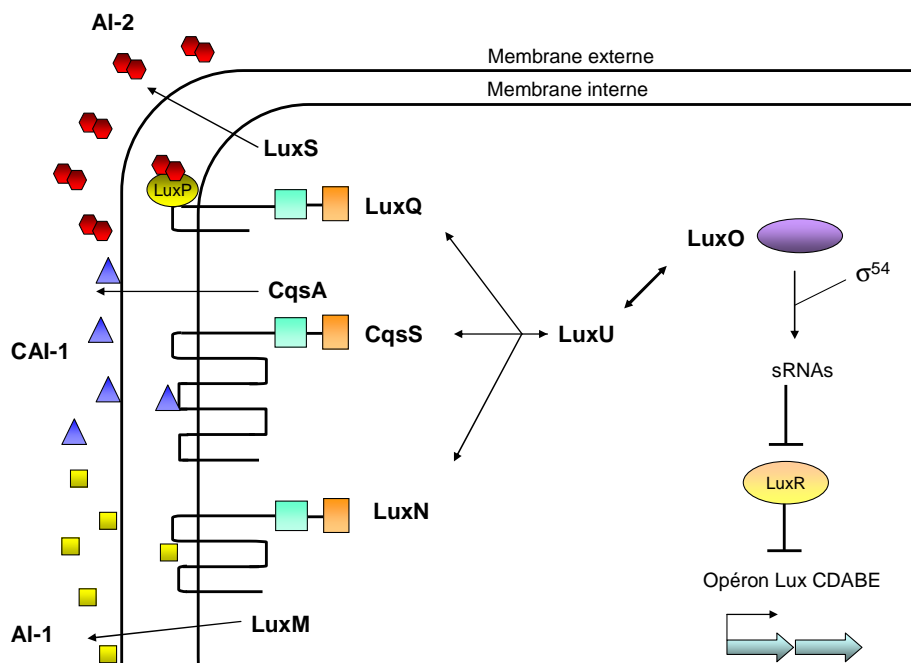


Figure 30 : Quorum sensing chez *V. harveyi* (adapté de Turoskiy *et al.*, 2008)

Les autoinducteurs AI-1 (en jaune), AI-2 (en rouge) et CAI-1 (en bleu) sont synthétisés par les protéines LuxM, LuxQ et CsqA respectivement. Ces molécules sont ensuite reconnues par des récepteurs spécifiques : LuxN, LuxQ et CqsS, qui induisent, via LuxU des modifications de LuxO (en violet). Celui-ci entraîne, à son tour, la synthèse d'ARN antisens qui bloquent LuxR (en jaune-orange) qui ne peut plus inhiber la transcription de l'opéron LuxCDABE.

De façon très intéressante, l'équipe de Bassler a commencé à décrypter la façon dont ces messages conjoints sont captés par une même bactérie, et comment la somme des informations se traduit par une réponse précise (Waters & Bassler 2006). Les auteurs ont identifiés 50 promoteurs régulés (11 induits et 39 réprimés) contrôlant 71 gènes, et ont

observé leur expression en fonction de différentes combinaisons d'autoinducteurs. Ils indiquent que les gènes cibles du quorum sensing sont différentiellement régulés par la même protéine LuxR, selon le niveau de chaque autoinducteur (étude basée seulement sur AI-1 et AI-2), et expliquent ce résultat par des affinités différentielles des promoteurs cibles pour LuxR. Ils distinguent ainsi trois classes de gènes cibles : (1) les gènes qui répondent complètement à la présence d'un seul autoinducteur ou des deux, et donc d'une faible quantité de LuxR, c'est-à-dire les gènes ayant des promoteurs avec une forte affinité pour LuxR ; (2) les gènes qui répondent uniquement quand les deux autoinducteurs AI-1 et AI-2 sont présents, c'est-à-dire les gènes ayant une faible affinité pour LuxR et (3) les gènes qui répondent de façon totale en présence des deux autoinducteurs, mais de façon intermédiaire quand un seul est présent (affinité moyenne pour LuxR).

Par ces systèmes de communication intra et inter-espèces, une espèce bactérienne est capable d'obtenir des informations sur sa propre densité cellulaire dans une niche écologique, mais aussi d'estimer sa proportion relative dans cet environnement.

2.10.2 Régulateur de virulence

Le quorum sensing régule de très nombreuses fonctions bactériennes, et il a ainsi été impliqué à de très nombreuses reprises, dans la régulation de la virulence des vibrions.

Chez *V. harveyi*, un lien entre l'expression de la protéine LuxR, la luminescence et la cytotoxicité des souches sur des cellules HeLa ou des hémocytes de crevette a été mis en évidence (Nakayama & Nomura 2005). Cette régulation de la virulence passe en fait par le contrôle de la quantité de protéases produites par le quorum sensing (Nakayama *et al.* 2006b). En utilisant un antagoniste naturel du quorum sensing, Manefield et ses collaborateurs ont montré la corrélation qu'il existe entre luminescence de *V. harveyi*, production de toxines et l'effet *in vivo* chez la souris et les crevettes (Manefield *et al.* 2000).

La production de nombreux facteurs de virulence chez *V. harveyi* est ainsi sous le contrôle du quorum sensing *in vitro* : le système de sécrétion de type III (Henke & Bassler 2004), les toxines extracellulaires (Manefield *et al.* 2000), les métalloprotéases (Mok *et al.* 2003) et les sidérophores (Lilley & Bassler 2000). La démonstration *in vivo* a été récemment faite chez *A. franciscana* ; en effet, les souches de *V. harveyi* mutées dans la voie de l'AI-2, luxS⁻ ou LuxP⁻ ne présentaient plus de toxicité (Defoirdt *et al.* 2005; Defoirdt *et al.* 2007b).

Par contre, l'addition d'AI-2 dans le système avec le mutant LuxS⁻ (qui ne peut plus produire l'AI-2) restaure la toxicité des souches (Defoirdt *et al.* 2006).

Les liens entre quorum sensing et régulation de la virulence ont également été établis chez la plupart des autres vibrions pathogènes, comme par exemple chez *V. alginolyticus* (Wang *et al.* 2007; Ye *et al.* 2008), chez *V. anguillarum* (Croxatto *et al.* 2002; Denkin & Nelson 2004; Defoirdt *et al.* 2005), chez *V. campbelli* (Defoirdt *et al.* 2007a), chez *V. cholerae* (Miller *et al.* 2002; Boardman *et al.* 2007; Higgins *et al.* 2007) et chez *V. vulnificus* (Kim *et al.* 2006).

De part l'importance de la régulation du quorum sensing dans l'expression de la virulence, des méthodes alternatives aux antibiotiques, basées sur l'utilisation d'inhibiteurs du quorum sensing ont été développées (Defoirdt *et al.* 2007b). Ces inhibiteurs peuvent être des substances chimiques naturelles, comme la vitamine C ou un composant de l'algue *Delisea pulchra*, ou des substances synthétiques. L'utilisation de ces inhibiteurs a déjà fait ses preuves en laboratoire, et également *in vivo* (Rasch *et al.* 2004). Ces auteurs ont mis en évidence une diminution des mortalités de truites suite à la baignade de *V. anguillarum* (de 80-100% à 4-40%) en présence de l'inhibiteur synthétique du QS, la Furanone C30.

Ces essais apparaissent prometteurs et sont basés sur l'observation de la protection naturelle contre les vibrioses, apportée par certaines bactéries probiotiques capables de bloquer le quorum sensing (Xavier & Bassler 2005). Chez *E. coli*, un transporteur membranaire capable de faire entrer l'autoinducteur AI-2 dans cette bactérie, et de le phosphoryler pour le piéger a d'ailleurs été mis en évidence (Xavier & Bassler 2005).

3. INTERACTION *V. HARVEYI* - ORMEAU

Très peu d'études traitent de l'interaction *V. harveyi* – ormeau. Néanmoins, quatre articles scientifiques s'attachent à décrire les interactions *V. harveyi* – *H. discus* et *V. harveyi* – *H. tuberculata*, et seront ici détaillés.

3.1. La vibriose de l'ormeau japonais

La première étude ayant mis en évidence l'implication de *V. carchariae* (maintenant synonyme de *V. harveyi*) dans des mortalités massives estivales d'ormeaux d'élevage japonais *H. diversicolor* date de 1998 (Nishimori *et al.* 1998). Cette étude s'attache à décrire la bactérie isolée pendant l'été 1997 au Japon. Les principaux signes relevés sont la présence de pustules blanches sur le pied des animaux, la perte d'adhérence de ceux-ci et leur mort rapide. Des cultures pures de bactéries ont pu être isolées du pied des animaux malades, et identifiées comme *V. carchariae* sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques, de leurs séquences d'ARNr 16s et suite à des hybridations ADN-ADN. Enfin, des infections expérimentales ont permis de confirmer la pathogénicité de ces bactéries envers l'ormeau japonais *H. diversicolor*.

La seconde étude date de 2007 et rapporte l'existence de mortalités saisonnières (mois d'août-septembre) d'ormeaux d'élevage *H. discus hanai* depuis 1980. Des mortalités considérées comme similaires et, selon les auteurs, qui seraient attribuables au même agent pathogène, ont été observées en 2002. Ainsi, en août 2002, 60 000 ormeaux sont morts en quelques jours ; ils présentaient des oedèmes hémolymphatiques, et le principal signe décrit par les auteurs est une perte de tonicité musculaire. Un agent pathogène a pu être isolé chez tous les individus malades testés et a été identifié biochimiquement et sur la base des séquences de plusieurs gènes comme étant *V. harveyi*. Des expériences de balnéation et d'injection ont permis de confirmer son statut de pathogène primaire (Sawabe *et al.* 2007).

Les auteurs présentent également des résultats sur la localisation du pathogène. Par l'utilisation d'une souche GFP, ils décrivent les branchies comme le premier organe potentiellement infecté par *V. harveyi*. De plus, des expériences menées à 15°C et à 20°C en balnéation amène les auteurs à suggérer l'importance de la température de l'eau sur le développement de la vibriose.

3.2. La vibriose de l'ormeau européen

Depuis les années 1997-1998, des mortalités massives et estivales d'ormeaux ont également été signalées le long du littoral français. Ces mortalités ont débuté en 1997, dans le sud de la Bretagne près de Concarneau. Elles se sont ensuite étendues en 1998 au nord de la Bretagne puis aux côtes normandes, dans le Golfe de St Malo en 1999. Les îles de Chausey et Jersey ont également été touchées en 1999 et 2000 par ces fortes mortalités qui peuvent faire disparaître, pour une zone géographique touchée, de 50% à 80% des stocks dans le milieu naturel comme dans les écloséries. A l'heure actuelle, de nombreuses zones sont encore touchées par cette pathologie, les dernières mortalités observées datant de septembre 2007 (Normandie). Il est cependant important de noter qu'avant les années 1997, aucun épisode de mortalité de cette ampleur n'avait été observé sur le littoral français, à l'exception de l'année 1963, où un hiver très froid a causé de fortes mortalités (Nicolas *et al.* 2002). Ces mortalités massives d'ormeaux ont eu un impact non négligeable au niveau des pêches, réduisant celles-ci de moitié et allant même jusqu'à entraîner, en 2005, la fermeture de la pêche professionnelle d'ormeaux en Normandie (Nord Cotentin, entre Quettehou et Barneville-Carterêt).

La première hypothèse avancée pour expliquer ces mortalités fut celle d'un dérèglement du cycle de reproduction de l'animal (Nicolas *et al.* 2002). Mais en 1999, suite à l'apparition de mortalités comparables au sein d'élevage (Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral, SMEL), un pathogène bactérien a pu être isolé dans l'hémolymphe des ormeaux. Par une caractérisation génétique et phénotypique, cette bactérie a été décrite comme appartenant au genre *Vibrio* et à l'espèce *carchariae* synonyme de *V. harveyi* (Nicolas *et al.* 2002). L'importance de la température (15°C vs 20°C) a été une fois de plus signalée, et des expériences de baignade et d'injection ont permis de confirmer l'impact de ce pathogène sur l'ormeau européen. Ce pathogène a pu être réisolé en 2000 sur des individus préalablement placés dans le milieu naturel, sur des sites connus pour avoir été touché par de fortes mortalités en 1998 et 1999.

Des travaux réalisés par Huchette et Clavier (2004) suggèrent que les mortalités associées à *V. harveyi* sont fortement corrélées aux températures estivales locales supérieures à 16,5°C durant les derniers mois d'été (Figure 31). La température pourrait jouer un rôle non seulement sur la croissance bactérienne (optimum de température 28°C (Austin & Zhang 2006)) mais aussi sur l'immunité des mollusques (Cheng *et al.* 2004c; Paillard *et al.* 2004a).

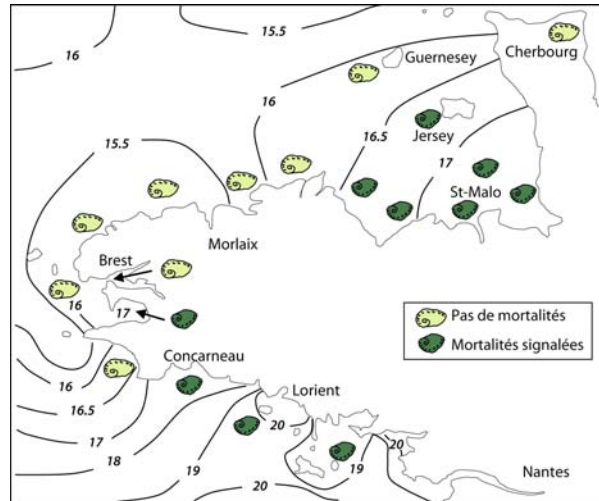


Figure 31 : Carte de Bretagne présentant les zones géographiques où des mortalités estivales d'ormeaux ont été signalées (adapté de Huchette et Clavier, 2004).

Les zones de mortalités signalées d'ormeaux (ormeau retourné en vert foncé) et les zones où aucune mortalité massive estivale n'a été rapportée (ormeau en jaune pâle) sont représentées. Les isothermes de températures moyennes relevées au mois de septembre sont également notés.

4. CONCLUSION

Les études concernant les maladies des ormeaux imputables aux vibrions sont nombreuses, surtout ces dernières années, de par leur impact sur l'industrie et sur les populations naturelles. Pourtant la compréhension de ces interactions reste limitée, en comparaison avec les vibrioses humaines ou même les vibrioses de bivalves.

La connaissance fine des facteurs déclenchant l'apparition de ces vibrioses, et des bases moléculaires des interactions est indispensable à la compréhension des mécanismes infectieux. Ceci pourrait permettre de limiter les fortes mortalités, en adaptant les techniques d'élevage et, dans le futur, en développant des méthodes prophylactiques. Ce travail de thèse s'est donc axé sur l'étude physiologique, cellulaire et moléculaire de l'interaction *V. harveyi* – *H. tuberculata*, dans l'espoir de comprendre cette maladie, et de pouvoir la détecter, la prévenir et peut-être un jour la guérir.

RESULTATS

CHAPITRE 1 : Diagnostique et facteurs de développement de la vibriose

La vibriose de l'ormeau est apparue dans les années 1997-98 en France, amenant la fermeture de la pêche professionnelle en Normandie en 2005. L'agent pathogène responsable a été identifié en 1999 comme étant *Vibrio carchariae* (synonyme de *V. harveyi*), une bactérie à Gram négative, par ailleurs connue pour sa toxicité envers les crevettes et les poissons (Nicolas *et al.* 2002; Austin & Zhang 2006). Les principaux signes macroscopiques de la maladie sont la perte de motricité musculaire et la léthargie, menant à 80% de mortalités en quelques jours (Nicolas *et al.* 2002). Ces fortes mortalités, pouvant toucher 50-60% du stock estimé, ont été observées sur le littoral français, durant les mois de septembre - octobre. Il est intéressant de noter que ces mois sont importants pour la physiologie des ormeaux, puisqu'ils correspondent à la période de ponte des animaux (seconde ponte en rade de Brest, et première ponte en Normandie), mais également au maximum de températures relevées en Normandie comme en Bretagne. A ce jour, les facteurs exacts influençant l'apparition de ces mortalités ne sont pas clairement déterminées. **La compréhension de ces facteurs est nécessaire à la standardisation de nos protocoles, et à l'étude fine du modèle d'interaction.** Aussi, dans un contexte de réchauffement climatique, qui se traduit par une augmentation de 1°C en Mer d'Iroise sur les vingt dernières années (Esnault & Barraer 2005), l'importance de la température et de l'état de maturation des animaux sur l'interaction *H. tuberculata* – *V. harveyi* a été étudiée.

Dans le cadre du premier article ici présenté ([Article 1](#)), une approche expérimentale combinant plusieurs températures et des animaux immatures à matures, a permis de démontrer (1) que seuls les animaux en période de reproduction, ou ayant traversé cette période, étaient susceptibles à la maladie ; et (2) qu'une différence de 1°C seulement conditionne l'apparition des mortalités. Enfin, le suivi des mortalités naturelles qui ont eu lieu pendant l'été 2007 a permis de confirmer que cette vibriose se développe dans le milieu naturel (1) en présence de la bactérie pathogène (2) en période d'effort de reproduction, et (3) quand les températures de l'eau sont maximales (et dépassent les 18°C).

De plus, dans le cadre des expériences présentées dans le premier article, certains résultats importants pour le diagnostic de la maladie n'ont pas encore été publiés. Ainsi, lors de la reproduction expérimentale des mortalités, des observations macroscopiques et des analyses histologiques des animaux moribonds ont été réalisées.

Macroscopiquement, les ormeaux affectés par la vibriose présentent des pustules blanches sur le pied, aussi bien sur les animaux prélevés dans le milieu naturel qu'en laboratoire (Figure 32A). Certains animaux présentent également des enfléments péricardiques (Figure 32B), et de façon générale, l'hémolymphe des individus moribonds apparaît de couleur jaune-marron (Figure 33C), traduisant la forte concentration en bactéries, qui peut atteindre jusqu'à 10^9 UFC/ml (Article 2), ou éventuellement une dégradation tissulaire ou une modification chimique de l'hémocyanine qui confère sa couleur bleue à l'hémolymphe.

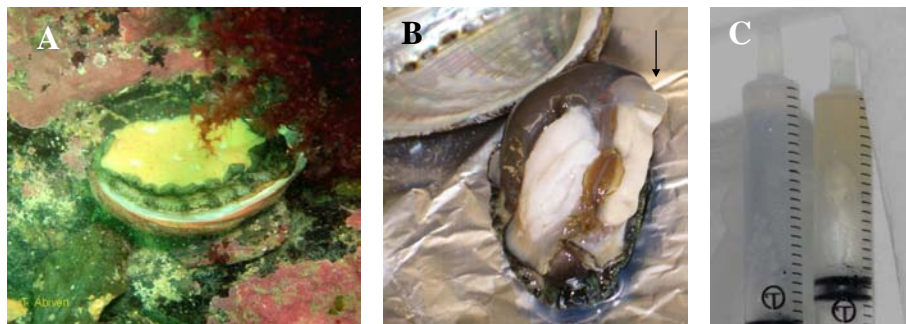


Figure 32 : Signes macroscopiques de la maladie

Observations réalisées dans le cadre des infections expérimentales et du suivi en milieu naturel présentés dans l'article 1. (A) Présence de pustules blanches sur le pied d'un animal moribond retrouvé dans le milieu naturel et diagnostiqué comme infecté par *V. harveyi* (Article 1). (B) Gonflement péricardique (flèche) observé lors de la reproduction expérimentale des mortalités. (C) Coloration de l'hémolymphe prélevée sur un individu contrôle ou sur individu un moribond à droite.

L'analyse bactériologique des pustules et de l'hémolymphe a permis de révéler des cultures pures de *V. harveyi* (sur différents milieux de culture et à différentes températures) (Article 1). Ces résultats sont en accord avec nos premiers résultats d'histologie classique, qui révèlent la présence d'amas bactériens au sein du muscle et l'absence d'infiltration hémocytaire à proximité (Figure 33). Cependant, lors du développement de méthodes

d'immunohistochimie qui auraient permis à la fois d'explorer finement tous les tissus et de confirmer que ces amas correspondent à *V. harveyi*, nous avons été confrontés à des problèmes de spécificité liés aux cellules à mucus, principalement. D'autres méthodes ont donc du être adaptées et vous sont présentées par la suite.

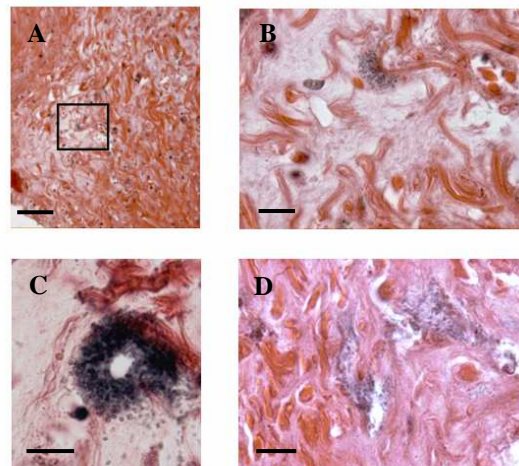


Figure 33 : Coupes histologiques (5 μ m) de muscles de moribonds

Echantillons provenant des infections expérimentales par balnéation réalisées dans le cadre de l'article 1, colorées à l'hématoxyline éosine. (B) Grossissement de l'image (A). (A) Echelle = 100 μ m. (B-D) Echelle = 10 μ m.

Cette première étude nous a ainsi permis de mieux connaître cette maladie et de déterminer les conditions favorables à son développement dans le milieu naturel, et donc les conditions expérimentales à utiliser pour la suite de nos expériences, dans le désir permanent de disposer d'un modèle expérimental au plus proche des conditions physiologiques naturelles.

Notre modèle expérimental étant déterminé, notre deuxième étude visait à mieux comprendre le développement de la maladie, en terme de tissus cibles et de dynamique bactérienne. Pour cela, une souche exprimant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) a été construite, validée en terme de croissance, stabilité et virulence, et utilisée au cours d'un cycle infectieux expérimental. L'utilisation de cette souche en cytométrie en flux a permis de quantifier la bactérie dans l'eau de mer environnante ainsi que dans l'hémolymphe des animaux. Ces résultats nous ont amené à proposer un schéma infectieux avec une phase d'incubation de 2 jours, suivie d'un relargage de la bactérie à partir de l'hémolymphe des animaux moribonds au 4^o jour d'infection. Sur les animaux moribonds, les bactéries

fluorescentes ont pu facilement être observées alignées le long des filaments branchiaux (sur les cils des cellules épithéliales) ainsi que dans le muscle (probablement au niveau des sinus hémolympatiques) et dans l'hémolymphe des ormeaux, atteignant des concentrations de 10^9 bactéries/ml (Article 2).

Cette première partie visait à illustrer les signes de la vibriose de l'ormeau européen, ainsi que la localisation musculaire de la bactérie, et sa forte concentration dans l'hémolymphe. Mais les points d'entrée, et l'étude de la pénétration bactérienne dans les premiers stades d'infections restent encore à définir. Enfin, le niveau d'implication, et l'importance de la réponse immunitaire de l'ormeau face à ce pathogène ayant comme cible l'hémolymphe de l'animal, apparaît comme un paramètre capital à étudier pour la compréhension de l'interaction *H. tuberculata* – *V. harveyi*.

Article 1 : Travers, M.A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J. L., Koken, M. and Paillard, C. (Soumis à Global Change Biology). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming.

Article 2 : Travers, M.A., Barbou, A., Le Goïc, N., Huchette, S., Paillard, C. and Koken, M. (Soumis à FEMS Microbiology Letters). Construction of a stable GFP tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamic analysis of abalone infection.

Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming.

Article 1: Soumis à Global Change Biology

Marie-Agnès Travers^{1,2}, Olivier Basuyaux³, Nelly Le Goïc², Sylvain Huchette¹, Jean-Louis Nicolas⁴, Marcel Koken^{2γ} and Christine Paillard^{2γ*}

1 France Haliotis, Kerazan, Lilia, 29880 Plouguerneau, France

2 Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin, CNRS UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

3 Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral (SMEL), Zac de Blainville, 50560 Blainville-sur-Mer, France

4 Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), BP 70, 29280 Plouzané, France

ABSTRACT

Haliotis tuberculata mass mortalities occurred in wild populations in France since 1998 during the reproductive period in conjunction with seawater summer temperature maxima and *Vibrio harveyi* presence. To confirm the importance of bacterial exposure, temperature and reproductive status on abalone susceptibility, experimental infections via bath exposure were performed using abalone ranging from immature to reproductively mature. Ripe abalone were more susceptible to the bacterium than they were immature ($p < 0.001$). Moreover, one degree difference in temperature had a highly significant impact on mortalities ($p < 0.001$). The natural mortalities that were surveyed during summer 2007 confirmed that recent epidemic losses of European abalone appeared in conjunction with host reproductive stress, elevated temperatures and presence of the pathogen *Vibrio harveyi*. Considering the elevation of temperature that has been observed in Brittany and Cotentin over the last twenty-five years, this temperature dependent vibriosis is a new case of emerging vibriosis associated with global warming.

* Corresponding author. E-Mail: christine.paillard@univ-brest.fr
Tel: +332 98 49 86 50
Fax: +332 98 49 86 45

^γ M.K. and C.P. should be considered as last co-authors

Keywords: abalone, disease, reproduction, field.

INTRODUCTION

Broadcast spawning invertebrates with high fecundities and larval dispersal were thought to be invulnerable to extinction, but evidence for decline and local extinctions of marine species is becoming more abundant (Jamieson, 1993; Myers & Worm, 2003). Abalone are an example of this global decline, and white and black abalones (*Haliotis sorenseni* and *H. cracherodii*, respectively) are actually listed as endangered species of concern in the USA (Gruenthal & Burton, 2008; Hobday *et al.*, 2001). Many authors suggest that different factors have contributed to fish and shellfish decline

including over-exploitation of the resource, inadequate enforcement policies, diseases and environmental changes (e.g. Vilchis *et al.*, 2005, Rothaus *et al.* 2004, Altstatt *et al.*, 1996)

Temperature elevation, due to global change, can directly influence marine populations by inducing physiological stress (Li *et al.*, 2007; Przeslawski *et al.*, 2005), or by disturbing oceanographic processes and, consequently, natural reproduction cycles (Lawrence & Soame, 2004). In addition to impacting macrofauna, global warming also influences microbiota including the behaviour of potential pathogens. Recent reviews have emphasized the importance of parasites and pathogens on terrestrial and marine taxa in the global warming process (Bally & Garrabou, 2007; Ward *et al.*, 2006; Harvell *et al.*, 2002).

European abalone *H. tuberculata* stocks are in decline (Huchette & Clavier, 2004), and numerous recent mortalities have been associated with the protozoan parasite *Haplosporidium montforti* (Azevedo *et al.*, 2006a; Balseiro *et al.*, 2006), rickettsia-like bacteria (Azevedo *et al.*, 2006b; Balseiro *et al.*, 2006) and bacteria of the genus *Vibrio* (Nicolas *et al.*, 2002) in both farmed and wild stocks. *Vibrio carchariae* strains (junior synonym of *V. harveyi* (Gauger & Gomez-Chiarri, 2002)) were isolated from natural and farm populations of *H. tuberculata* in France during mass mortality episodes in September 1998 and 2000 (Nicolas *et al.*, 2002). The Gram-negative bacterium, *V. harveyi*, is known to induce gastroenteritis in fish (Lee *et al.*, 2002) and shellfish mortalities (Austin & Zhang, 2006; Aguirre-Guzman *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 2002; Goarant *et al.*, 2000; Nishimori *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1996).

Abalone mortalities were recorded in both natural and farm populations exclusively at the end of summer, when seawater temperatures reached their maximum. A correlation between local maximum temperature and appearance of mortalities in France was proposed by Huchette and Clavier (2004). Moreover, the abalone reproductive cycle appeared as an important factor associated with mortalities (Nicolas *et al.*, 2002; Nishimori *et al.*, 1998). Numerous diseases are known to be linked to reproduction. The best example is the oyster *Crassostrea gigas* summer mortalities that have been linked to energy deficiency during the reproduction period (Delaporte *et al.*, 2007; Samain *et al.*, 2007; Perdue *et al.*, 1981).

In the present work, we examined factors influencing the interaction between *V. harveyi* and *H. tuberculata* in an attempt to better understand the emergence of diseases, with emphasis on vibriosis in abalone as our model. Thus, we conducted (1) experiments to test the influence of various conditions (temperature, gonad condition and age/size) on disease development and (2) field surveys during mortality periods, where different parameters were recorded (mortality percentage, temperature and reproductive status).

MATERIAL AND METHODS

A. Laboratory experiments

1. Biological material

Young adults. Immature (n=200, 29.0 mm \pm 1.6, 1 ½ years old) and ripe abalone (n=500, 35.0 mm \pm 2.1, 2 years old) were transferred from the hatchery of France Haliotis (Plouguerneau, France) to the LEMAR laboratory of the University of Western Brittany in March 2006 and August 2006, respectively. The LEMAR laboratory received flowing ambient seawater at 34 ppt of salinity.

Adults. Adult abalones (n=240, 70.0 mm \pm 15.4 mm, >4 years old) were fished in North Cotentin (near Fermanville, Normandy, France) and transferred in June 2006 to the experimental marine station of “Syndicat Mixte pour l’Equipement du Littoral” (SMEL). Just after fishing, adult abalones were treated for 3 days with antibiotics (Flumiquil 10% - 80 g/m³ and Adjusol TMP Sulfa liquid 50 ml/m³) to prevent bacteria associated mortalities.

Bacterial strains. The virulent *Vibrio harveyi* strain (ORM4), previously isolated in 2002 from infected *Haliotis tuberculata* in Normandy (France) (Nicolas *et al.* 2002), was used for challenge experiment. *V. halioticoli* LMG19700 was used as negative control for PCR bacterial identification. Bacterial cells were grown in Luria-Bertani Broth complemented with salt (10g/l, LBS) at 28°C for 18h, washed twice in filtered and sterile seawater (FSSW) and resuspended in FSSW.

2. Inducing gonad ripeness in adult abalone

To obtain abalone at different maturation stages for use in experimental bacterial challenges, adult abalone (described above) were divided into two batches of 120 animals and maintained for one month under two different batch conditions. In one batch, called “Ripe Batch”, seawater was held at 13°C to maintain gonad maturation stages 4 and 5 (ready to spawn) at the time of bacterial challenge. In the other batch, called “Post-spawning Batch”, seawater was held at 18°C and abalone were spawning (stage 6) at the time of bacterial challenge (Figure 1). To confirm the maturation status of abalones, histological sections were performed and gonad development stages scored as described below (see section B.4. *Gonadal development determination by histology*). During this experiment, animals were held in static, aerated tanks and were fed *ad libitum* marine algae *Gracilaria* sp. and *Palmaria* sp. Seawater was renewed every day and temperature was recorded using an electronic thermostat (± 0.1 °C).

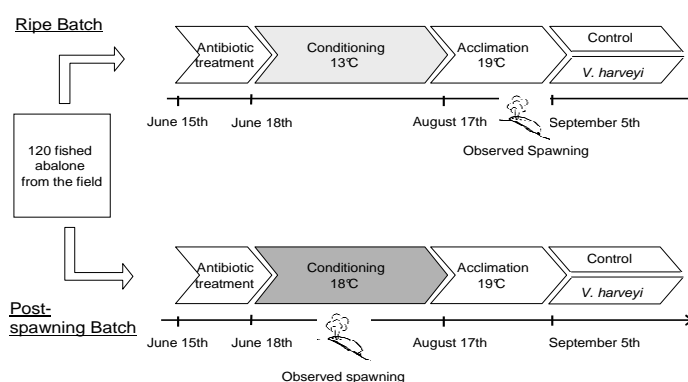


Figure 1: Experiment design. The 120 fished abalone were treated by antibiotic, conditioned for 2 months at 13°C (“Batch ripe”) or 18°C (“Batch post-spawning”), acclimated at 19°C before bacterial challenge, as described in material and methods. Observed spawning are indicated by a picture.

3. Experimental challenges

In order to assess the influence of several stressors on susceptibility to infection with *V. harveyi*, we employed a standard 24 hr bath exposure to abalone in conjunction to single stressors in abalone of varying stages of maturation. The standard bacterial challenge was adapted from Nicolas *et al.* (2002). ORM4 *V. harveyi* was grown overnight at 28°C, centrifuged, washed twice in filtered sterilized seawater (FSSW), and resuspended in FSSW. For the challenge, a bacterial suspension was inoculated into seawater at 10^5 cell ml^{-1} (final concentration) and 10 young abalone were immersed in seawater. Just dead abalones of this challenge were ground in FSSW, and the suspension was gently centrifuged and then filtered (1 μ m) to limit particle size and used as inoculum. Bacterial challenges consisted of distribution of this mixture at a final concentration about 10^5 CFU/ml, checked by plating, into 5 L tanks (for young abalone) or 40 L tanks (for adults) containing filtered (0.5 μ m) seawater. For each experiment, triplicate groups of 20 abalones were placed in each inoculated tank, seawater was renewed every day, temperature was monitored daily and dead abalone were counted and removed twice daily.

Experimental batches and conditions are presented in the [Table 1](#).

Age	Batch	N*	Size	Maturation Stage	Lab Conditioned	Source	Experiment
	"immature"	200	29.0 \pm 1.6	Immature	No	Hatchery	Ripeness effect
Young	"ripe"	500	35.0 \pm 2.1	Ripe	No	Hatchery	Temperature effect
							Ripeness effect
	"post-spawning"	120	70.0 \pm 15.4	Stage 3	Yes	Field	Ripeness effect
Adults	"ripe"	120	70.0 \pm 15.4	Stage 4-5	Yes	Field	Temperature effect
							Ripeness effect
							Size-age effect

Table 1: *Haliotis tuberculata* experimental batches and conditions.

* Number of abalone per batch

a) Temperature effect

To understand the relationship between seawater temperature and bacterial susceptibility, abalone were exposed to *V. harveyi* under a range of temperatures that reflect the range of summer temperatures recorded for north western France (see section B.1. below). In the first experiment, the 1.5 yr old, farm-raised, mature abalone were challenged with the bacterium via the 24 hr bath exposure method described above at the following temperatures: 15°C, 17°C, 18°C, 19°C and 20°C. In a second experiment, the wild-caught, adult abalone from the “Ripe Batch” (see section A.2. *Inducing gonad ripeness in adult abalone*) were challenged as above at the following temperatures: 15°C, 17°C and 19°C. Mortalities were monitored as above throughout each study (10 days and 22 days, respectively).

b) Ripeness effect and age-size effect

To determine the influence of stage of reproductive maturation and abalone size, we challenged all four groups of abalone – 1. large adults, 70 mm abalone from the “Ripe Batch” (stage 4-5); 2. large adults, 70 mm abalone from the “Post-spawning batch” (stage 6); 3. small young adults, 35 mm, farmed mature abalone; 4. small young adults, 29 mm, farmed immature abalone – were challenged with bacteria for 24 hr as explained above and held at 19°C. Mortalities were monitored as above throughout the 22 day study.

B. Field survey

1. Temperature

From 1991 to 2006, mean daily values of seawater temperature in Flamanville (Cotentin, Normandy, France) were obtained from EDF French Energy Company (CNPE Flamanville). Seasonal means were calculated.

Temperature probes were placed at the Bretteville site (Cotentin, Normandy, France) in the proximity of a group of abalone, and temperature was registered every hour over the survey period. Daily means were calculated.

2. Animal and seawater sampling

Eighty abalone were collected by SCUBA divers at Bretteville site (Cotentin, Normandy, France) from July 2007 to November 2007 (10 abalone at each sampling date). The number of samples taken per month varied according to the period with more samples when loss was predicted: July (n=1 sampling), August (n=2), September (n=3), October (n=1), November (n=1). Seawater (100 mL) was also collected at 1m of depth and at the seawater-sediment interface using 100 ml syringe by SCUBA divers. Seawater samples were transported to LEMAR on ice and used to determine bacterial concentration (see section B.5. *Bacterial count and identification*). In July 2007, 50 abalone were also collected from this same site and transferred into an abalone culture container that consisted of a PVC pipe measuring 70 cm in length and 47 cm in diameter. After placing abalone and local kelps, each opening of the pipe was covered with 6 mm mesh Nynetex screen and the pipe was located in the work site. Mortalities were checked by counting died and alive animals at approximately weekly intervals from July to November. Haemolymph from moribund abalone or those which appeared to be recently died was aspirated with a 25 G needle and 2 ml syringe. Aliquots (100 µl) and muscle homogenate were diluted and plated on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS a vibrio selective medium, AES Laboratory) and incubated at 28°C and the rest of animal was frozen (-20°C) for later testing of the pathogen.

3. Biometry and condition index

In the laboratory, each abalone was removed from its shell and to the pedal-adductor muscle was separated from the viscera. Abalone length, wet and dry (80°C for 48 h) weights of the viscera were measured. Visceral (VCI) condition indexes were calculated as follows:

Condition index = Organ dry weight*100/shell length³

4. Gonadal development determination by histology

Histology examination was used to characterize the reproductive maturation of individual abalone. A 5 mm section of the viscera that contained gonad and digestive tissues was weighed, fixed in Bouin's solution (Bancroft and Stevens, 1982) for 48h, dehydrated in an ascending series of ethanol and embedded in paraffin. Sections of 5 µm thick were stained with Masson's trichrome (Bancroft and Stevens, 1982). Each histological section was examined using light microscopy. Animals were assigned into one of the six gonadal developmental stages according to Sobhon (1999). Stage 1 corresponds to pre-proliferative stage (gonad is essentially undifferentiated with little or no germinal epithelium between the outer mantle epithelium and the digestive gland), stage 2 corresponds to the proliferative stage (oogonia form clusters on trabecular walls and become stalked at about 10 µm), stage 3 corresponds to the advanced development stage (an early ripening ovary is rized by newly stalked oocytes measuring about 25µm, vitellogenesis is initiated during this stage), stage 4 corresponds to the ripe stage (ovary has oocytes measuring >110 µm, mature oocytes are free from the trabeculae), stage 5 corresponds to a partially spawned animal (ovary contains reduced densities of mature oocytes relative to ripe gonads), stage 6 is the spent stage (characterized by lack of ripe gametes and slight gametogenic activity).

For each female, 10 randomly chosen fields were selected from which the area of about 150 individual mature oocytes (with clearly visible nucleoli to ensure that each section passed through the centre of the gamete) was measured using Image-Pro Express v6.0. Theoretical diameters were then calculated: Theoretical diameter = Racine (4*Surface/pi).

5. Bacterial count and identification

To detect the presence of *V. harveyi* in abalone (within haemolymph or within muscle tissues), seawater (water column or at the seawater-sediment interface), aliquots of each sample type were serially ten fold diluted in FSSW and 0.1 ml spread onto three types of media. These included Luria-Bertani Broth (LB, Sigma with 10g.L⁻¹ NaCl, LBS), Vha (*V. harveyi* specific medium; Harris *et al.*, 1996) and TCBS. Plates were incubated at either 18°C (LBS) or 28°C (Vha and TCBS) to reflect ambient seawater temperatures and culture optima for this bacterium, respectively.

Predominant strains were isolated from TCBS and Vha media, purified three times and then characterized by PCR using toxR specific primers for *V. harveyi* (Conejero & Hedreyda, 2003) and by 16S rDNA primers followed by sequencing of amplicons and BLAST analyses. Prior to PCR analysis, bacteria were cultured overnight in LBS broth media at 28°C and DNA was extracted using a traditional phenol-chlorophorm method (Sambrook *et al.*, 1989), and 10 ng of DNA was used as template for the PCR reactions. DNA isolated by similar method for *V. halioticoli* LMG19700 and *V. harveyi* ORM4 was used, respectively, as negative and positive control for PCR. The 16S rDNA was amplified in 50µl reactions by using the following universal eubacterial primers and reaction conditions of Kalmbach *et al.* (1997): Forward primer – 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' and reverse primer – 5' CGGYTACCTTGTTACGAC 3'. ToxR DNA was amplified in 25µl reactions with specific primers Vh-toxR-F 5'-TTCTGAAGCAGCACTCAC 3' and Vh-toxR R 5'-TCGACTGGTGAAGACTCA 3' and reaction conditions of Conejero & Hedreyda (2003). PCR products were run on 1.0% agarose gels containing 0.1 µg/mL ethidium bromide and visualized using a UV transilluminator. The 16S rDNA PCR product of the isolates was sequenced, and compared with previously available sequences in NCBI (National Center for Biotechnology Information) using the BLAST algorithm (Basic Local Alignment Search Tool).

C. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using STATGRAPHICS Plus 5.1 statistical software. Comparison of cumulative mortalities (1) between young and older ripe abalone (between day 5 and 10), (2) between young ripe abalone at day 10 and older ripe abalone at day 22 and (3) between adult "Ripe Batch " and adult "Post-spawning Batch " at day 22, were analysed using ANOVA with replicates and (4) by an ANCOVA using date as factor and origin as cofactor. Correlation between abalone size (length) and death day was estimated with the Pearson correlation coefficient. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$ and correlation were retained when $p < 0.1$.

RESULTS

A. Evidence of seawater temperature increase in Normandy

A 1.9°C increase in the mean summer seawater temperature in Normandy was documented by comparison of mean seawater temperatures from 1991 to the present. This increase in seventeen years leads to the present mean summer seawater temperature, which reached 17.5°C in 2007 (Figure 2).

B. Factors impacting abalone susceptibility to *V. harveyi*: an experimental approach

Temperature effect

Experimental infections of young naturally ripe abalone tested at five temperatures (15°C, 17°C, 18°C, 19°C and 20°C) revealed that 5 days after immersion challenge with *V. harveyi* no abalone mortality occurred at 15°C or 17°C. However, when temperatures were 18°C or higher, 80% of the abalone died (Figure 3, $p < 0.001$). Similar results were obtained with ripe adult abalones: 0% mortality at 15°C and 17°C, and 83% mortality at 19°C after 20 days (data not shown).

Age and size effect

Mortality after challenge at 19°C was estimated in young and adult ripe abalone. Losses of young ripe abalone occurred between days 5 and 10, while those of older ripe animals occurred over a more prolonged period ($p = 0.0001$). However, cumulative losses were similar between young ripe (80%) and adult abalone (75%) ($p = 0.0987$, Figure 4). No correlation between size and death day was detected among mature abalone ($p = 0.189$, $n=72$). An ANCOVA using days after infection as the main factor and origin as cofactor showed that mortality rates depended on day and on abalone origin ($p < 0.001$).

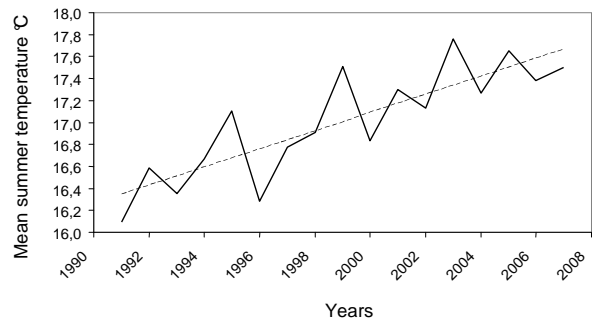


Figure 2: Flamenville (Normandy) summer mean water temperature (in °C). Trend is indicated by the dot line.

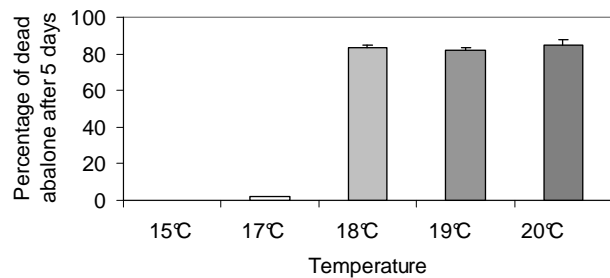


Figure 3: Temperature influence on *V. harveyi* associated mortalities. Young ripe abalone were exposed at 15°C, 17°C, 18°C, 19°C or 20°C, by immersion to 10^5 bacteria/ml during 24h. Seawater was changed daily. Dead abalone were counted twice a day. Bars show standard error.

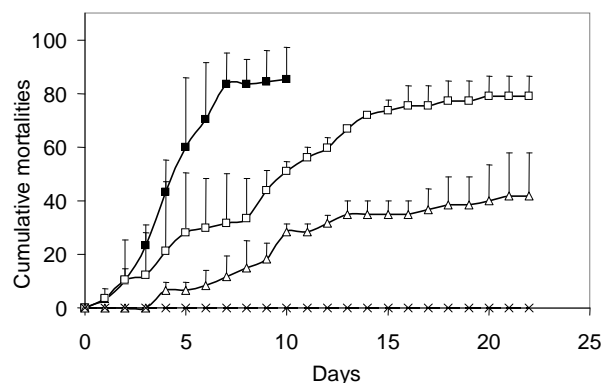


Figure 4: Age, size and gonad maturation influence on *V. harveyi* associated mortalities. Abalone were exposed by immersion at 19°C to 10^5 bacteria/ml during 24h. Seawater was changed daily. Dead abalone were counted and removed twice a day. Bars show standard error. Black boxes correspond to 2-years old ripe abalone from hatchery. White boxes to >4-years old ripe abalone from field. White triangle to >4-years old non-ripe abalone from field. Crosses to controls without bacteria.

Ripeness effect

After bath exposure with *V. harveyi*, up to 85% of the "Ripe Batch" abalone (partially spawned at the beginning of the experiment, stage 4-5) died within 15 days, whereas only 40% of the "Post-spawning Batch" abalone (stage 6) died during this period ($p = 0.0408$, [Figure 4](#)). In addition, immersion challenges using young abalone in which gonads were in an advanced but not yet fully mature stage (March 2006, stage 3) failed to induce mortality in presence of *V. harveyi* (0% mortality after 3 weeks and 2 consecutive infections - [data not shown](#)).

C. Field survey

Natural mortalities

Losses of abalone placed in the culture pipes in Normandy (France) were recorded during summer 2007 between August 28th to October 2nd. The mortality reached 63% at the end of the survey period in November ([Figure 5C](#)).

Spawning

Microscopic examination of stained tissue sections revealed evidence of reproductive development (between the July 18th and September 4th) and release of mature oocytes (between the September 4th and 11th, [Figure 5A](#)). Oocytes reached the maximum size of 124 μm ([Figure 5](#): Image A5 on September 4, 2007) before being released from the gonad ([Figure 5](#): Image A6 on September 11, 2007). Between September 4th and 11th, a decrease in visceral condition index (VCI) was observed in conjunction with histological evidence of spawning ([Figure 5A, B](#)). This period coincided with the abalone mortalities.

Seawater temperature

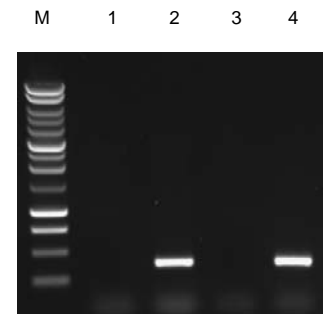
The seawater temperature in Normandy varied from 14.4°C to 17.9°C during the survey period (mean 16.8°C \pm 0.9°C). Spawning occurred at the seawater maximum temperature of 17.9°C ([Figure 5D](#)) and mortality was in ascension.

Microbial patterns

Total vibrios contained in the water column and at the seawater-sediment interface changed over the course of the study. At the seawater-sediment interface, the concentration of vibrios was high (mean of 6×10^6 CFU/ml during the survey), and reached its maximum concentration (4×10^7 CFU/ml) in September ([Figure 5D](#)). Similar trends in vibrio counts were quantified from the water column with a maximum in September (2×10^5 CFU/ml) and a mean of 4×10^4 CFU/ml. A correlation between vibrio concentration near sediments and instantaneous mortalities was found (correlation coefficient = 0.694), even if single regression was not significant ($p = 0.08$) and analyses data were low ($n=7$).

V. harveyi was isolated from the seawater-sediment compartment only in August, September and October. It was identified by morphological aspect, growth on Vha selective media, positive amplification with toxR specific PCR. Alignments and BLAST of the 1500 bp of the 16s rDNA sequence also confirmed our identification.

During the mortality period (see section B *Natural mortalities*) high concentrations of vibrios were isolated from haemolymph and muscle tissue of moribund abalone. A mean of 1.1×10^8 CFU/ml (s.e. 0.7×10^8 CFU/ml) was found in the haemolymph of affected animals. Pure cultures of *V. harveyi* were isolated on all media tested, from haemolymph and muscle of these abalone, as evidenced by morphology, growth on Vha, positive amplification with toxR specific PCR ([Figure 6, Line 4](#), strain 07021 from a moribund abalone), and 16s rDNA sequencing.



[Figure 6](#): Amplified fragments produced in toxR PCR Line 1, 2 and 3 controls from with distilled water, *V. harveyi* ORM4 DNA and *V. haliotocoli* DNA. Line 4 corresponds to strain 07023 isolated from haemolymph of moribund abalone in 2007 in Normandy (France). Lane M is a 1kb marker (Promega).

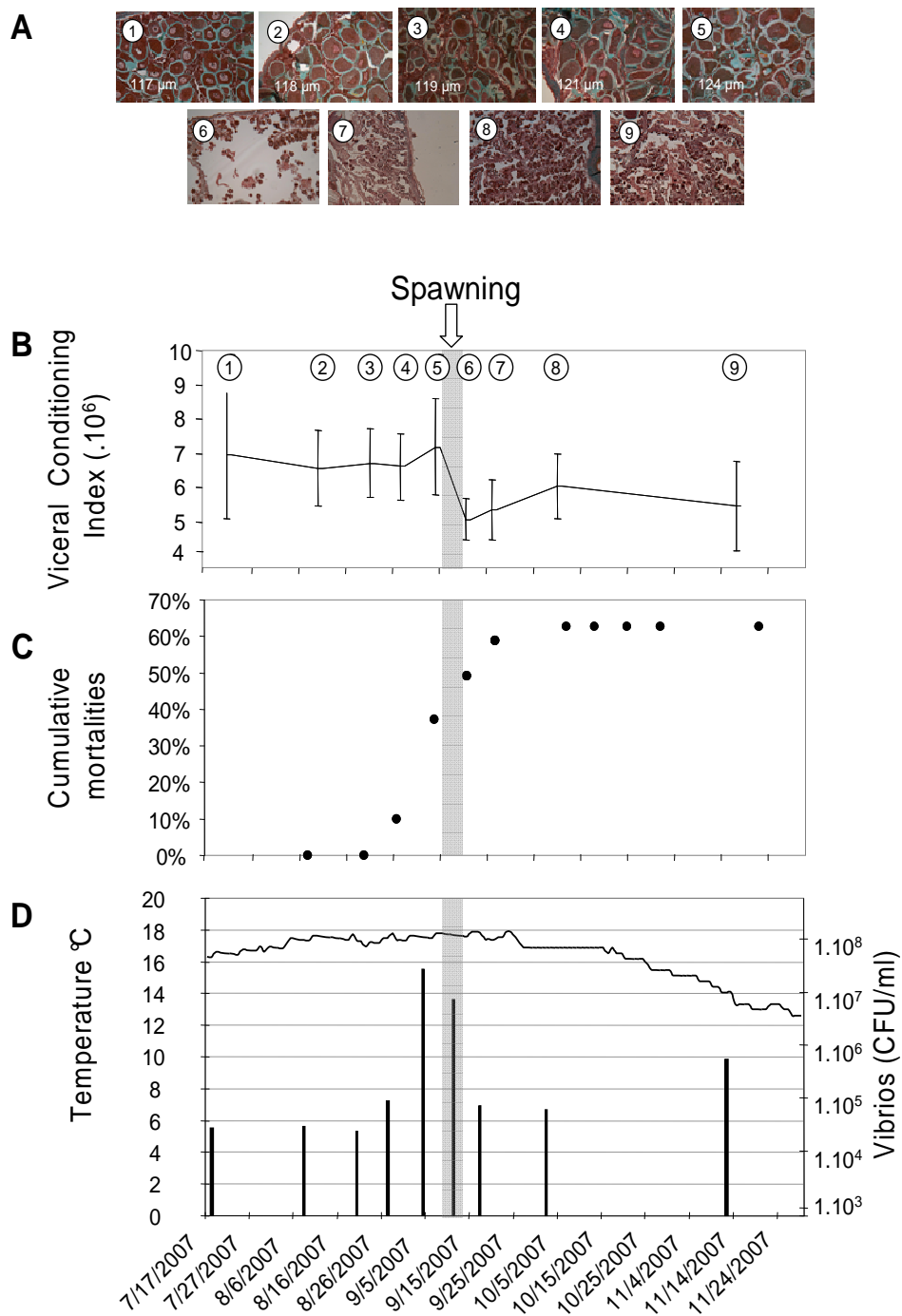


Figure 5: Field survey (July to November 2007)

A. Evolution of ovocytary diameter within the season. Mean diameter of mature oocytes is indicated in the white boxes at the left down corner of picture. Numbers correspond to date ① 7/18, ② 8/07, ③ 8/20, ④ 8/27, ⑤ 9/04, ⑥ 9/11, ⑦ 9/17, ⑧ 10/02 ⑨ 11/12.

B. Evolution of visceral conditional index and estimation of spawning date.

C. Cumulative mortalities recorded on the 50 abalone in a pipe. Grey section corresponds to the estimated spawning date.

D. Seawater temperature and vibrios count in sediment-water interface. vibrios count corresponds to 28°C TCBS grown bacteria. Grey section corresponds to the estimated spawning date.

DISCUSSION

This paper highlights the current and potential future impacts of global warming (increased seawater temperatures) on the host-parasite relationship between *H. tuberculata* and its recently emerged pathogen *V. harveyi*. As abalone populations continue to decline world-wide, additional stressors such as increased temperatures and its influence on host physiology and susceptibility to pathogens will further hinder restoration and management of these important herbivores and their fisheries. Although we found an apparently small increase in seawater temperature of 1.9°C, such increases may be crucial for disease expression. European abalone only died upon exposure to the *V. harveyi* at temperatures greater than 17°C (18°C in the present study). Similarly Harvell *et al.* (2002) illustrated how as small as a 1°C temperature elevation could alter the host-parasite relation in favour of the pathogen and lead to epidemic disease. Given these observations, it is important to have a thorough understanding of factors that contribute to disease transmission and expression using a combination of field and laboratory studies as we have conducted with *H. tuberculata* and its vibrio pathogen. Furthermore, implication of gonadal condition and abalone age were also analysed and considered to be involved in the abalone mortality phenomena in Normandy.

The present study tried to associate data of *V. harveyi* associated-mortalities with temperature and gonadal development. We found that mortalities appeared when temperature reached more 17°C, on the spawning period and when the pathogenic bacteria *V. harveyi* proliferate.

Temperature

Temperature modulates the physiology of poikilothermic organisms including marine invertebrates as well as their pathogens. Many vibriosis are known to be influenced by temperature, including those infecting corals (Banin *et al.*, 2003; Ben-Haim *et al.*, 2003), bivalves (Paillard, 2004a), fishes as salmon (Colquhoun & Sorum, 2001), starfish (Stahli *et al.*, 2008) and others. Growth, adherence and virulence factor expression of vibrios are directly influenced by temperature (Lin *et al.*, 2004; Johnston & Brown, 2002; Colquhoun & Sorum, 2001; Toren *et al.*, 1998). In addition, host susceptibility to a pathogen may also be influenced as observed in the present study for European abalone face to *V. harveyi*. We demonstrated a clear threshold of temperature (17°C) was shown to influence the appearance of mortality in ripe European abalone: At or below 17°C, little or no losses were observed. Thus the observed increase in seawater temperature impacted the *V. harveyi* – associated abalone mortality was previously suggested by Huchette & Clavier (2004) and Nicolas *et al.* (2002). It is important to consider this temperature threshold of 17°C found in our experimental challenges as the Iroise Sea (Brittany, France) has experienced a warming trend of about 1°C over ten years (from 17°C to 18°C (Esnault & Barraer, 2005) i.e. from a temperature where infections of *V. harveyi* could not develop, and were not observed, to a temperature where disease developed). Mean summer seawater temperatures in Normandy (France) showed a similar trend. Collectively, this suggests that seawater warming is a key factor acting in promoting *V. harveyi* associated mortality in Normandy and Brittany, France. Similarly, vibriosis of *H. diversicolor supertexta* was also shown to be temperature-dependant (Lee *et al.*, 2001). In Taiwan, susceptibility of *H. diversicolor supertexta* to *V. parahaemolyticus* is influenced by the increase of the temperature; abalone were more resistant to infection when temperature was 24°C than when temperatures were 28°C and 34°C (Cheng *et al.*, 2004). In addition, Vilchis *et al.* (2005) also showed a negative effect of ocean warming on red abalone (*H. rufescens*) by promoting another fatal bacterial disease of abalone, withering syndrome.

Establishing a relationship between environmental vibrio concentrations and abalone mortalities furthers our understanding of the host-parasite relationship as well as enhances predictive capabilities and thereby may enable forecasting of vibrio-related mortalities. A positive correlation existed between vibrio concentration in the column seawater or at seawater-sediment interface and abalone mortality in France. Similar correlations between temperature and vibrio concentration in field were previously suggested (Gonzalez-Acosta *et al.*, 2006; Stabili *et al.*, 2005) as seasonality of infection corresponded to warm-water months with high vibrio concentrations. The concentrations observed in the present study (means of 6×10^6 CFU/ml and 4×10^4 CFU/ml at the seawater-sediment interface and in the water column, respectively) are higher than those generally reported in association with

animal mortalities (Comeau & Suttle, 2007; Thompson *et al.*, 2004; Pujalte *et al.*, 1999); several authors have, however, reported similar ranges of bacterial densities in the environment (Raghunath *et al.*, 2007; Koren & Rosenberg, 2006). The concentration of vibrios is often 80x higher at the seawater-sediment interface than in the water column (Comeau & Suttle, 2007). We observed a similar trend in this study. Given the benthic nature of abalone and their herbivorous grazing nature, they are more likely to be exposed to lethal doses of vibrio if more bacteria are present in this part of the environment.

Low seawater temperature can induce changes in *V. harveyi* physiology, as the bacteria enter into the Viable But Non Cultivable state (VBNC). In a case of fish disease, *V. harveyi* can resuscitate from the VBNC non virulent state to a growing virulent state, when temperature up-shifted (Sun *et al.*, 2008).

Temperature can act on bacterial growth and virulence, and also on animal susceptibility to diseases by changing its physiological and immunological status (Gagnaire *et al.*, 2006; Paillard *et al.*, 2004b). Stressors are known to induce immune suppression (Hooper *et al.*, 2007; Monari *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2004; Malham *et al.*, 2003). Therefore, stress caused by temperature increase and spawning effort, may contribute to render intertidal molluscs more susceptible to disease (Chu, 2000).

Spawning

Spawning was the second most important factor directly influencing mortalities caused by *V. harveyi*. In this study, a clear difference in susceptibility to *V. harveyi* was observed between ripe and immature animals at 19°C. Immature abalone were insensitive to *V. harveyi*, while ripe (stage 4-5, ripe - partially spawned) or post-spawning (stage 6 spent) abalone were susceptible to infection and mortality. Production of gametes and its elimination are known to be associated with an energy deficit (Dridri *et al.*, 2007; Barkai & Griffiths, 1988). Hayashi (1983) observed a decrease in the glycogen content of muscle during gonad maturation of *H. tuberculata*. Spawning effort has also been well documented as a key factor in summer mortality of *C. gigas* (Delaporte *et al.*, 2007; Royer *et al.*, 2007; Samain *et al.*, 2007; Pouvreau *et al.*, 2003). Recently, Li *et al.* (2007) described the influence of spawning on the thermal resistance of Pacific oysters. More post-spawning oyster died in response to a temperature shock than pre-spawning oysters; this difference was attributed, in part, to a decrease in production of heat shock proteins and to a reduced immune response (Li *et al.*, 2007).

As in other molluscs, abalone gonadal maturation is directly controlled by temperature (Lopez & Tyler, 2000) and spawning can be induced by thermal shock. Thus, in the natural environment, spawning and temperature are interrelated. In the present study, analysis of these three factors in addition to natural mortalities revealed that the appearance of disease was associated with different events: (1) Seawater temperature, as mortalities appeared when temperature was higher than 17°C, (2) Abalone gonad maturation, as mortalities appeared centred on spawning period (2 weeks before and after spawning) and (3) The presence of the pathogenic bacterium *V. harveyi*, that was isolated during these mortalities from the haemolymph of moribund abalone and surrounding seawater.

Age / Origin

The influence of age, size and origin on disease susceptibility is often important in managing diseases. In the current study, reproductively mature abalone from the field and hatchery were both susceptible to the vibriosis and animal size did not appear to influence susceptibility. Disease expression among farmed mollusc populations is often higher than in wild conspecifics: it has been related to increased stressors and or reduced genetic diversity in farmed populations, such as observed in Pacific oysters with summer mortality (Gagnaire *et al.*, 2007). Although we did not observe losses within abalone farms, use of both wild and farmed abalone allowed us to compare susceptibility between both populations under the same experimental conditions. Despite large differences in animal size, ~80% of both farmed and hatchery abalone died. However, the mortality rate differed between these groups with a faster rate for farmed (80% losses in 5 d) than for wild abalone (~80% losses after 2-3 wks). Thus, the duration of elevated water temperatures among reproductively mature abalone of different sizes (e.g. 35mm vs 70mm) or origins (farm vs wild) could influence the outcome of vibriosis. These data suggest that although, age/origin did not appear to be the most important parameter influencing vibrio-induced mortality, further studies are needed to better understand this relationship.

In conclusion, this is the first report of a negative effect of global warming on European abalone stocks by influencing gonad maturation and spawning date (Lawrence & Soame, 2004), probably abalone immune function and bloom dynamics of a pathogenic vibrio. The one-degree increase that occurred in France during the last ten years seems to be directly responsible for recent *H. tuberculata* mortalities in Normandy and North of Brittany. The physiological changes induced by global warming, including small, one-degree increases in temperature on bacterial physiology and animal immunity warrant further study.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Christophe Louis-dit-Guérin (EDF, France) for water temperature data and Stéphanie Pétinay, Jean-Louis Blin and Sébastien Pien (SMEL) for scuba divers. We also thank Dr Patricia Mirella da Silva and Dr Carolyn S. Friedman for their careful revision and correction of the manuscript. This study was supported by 'France Haliotis' SCEA, and the "Région Bretagne". This publication is contribution n°xxx of the European Institute for Marine Studies IUEM (Brest, France).

REFERENCES

- Aguirre-Guzman, G., Ruiz, H. and Ascencio, F. (2004). A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, **35**, 1395-1404.
- Altstatt, J. M., Ambrose, R. F., Engle, J. M., Haaker, P. L., Lafferty, K. D. and Raimondi, P. T. (1996). Recent declines of black abalone *Haliotis cracherodi* in the mainland coast of central California. *Marine Ecology Progress Series* **142**(1-3), 185-192.
- Austin, B. and Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letter of Applied Microbiology*, **43**(2), 119-24.
- Azevedo, C., Balseiro, P., Casal, G., *et al.* (2006a). Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **92**(1), 23-32.
- Azevedo, C., Conchas, R. F., Tajdari, J. and Montes, J. (2006b). Ultrastructural description of new Rickettsia-like organisms in the commercial abalone *Haliotis tuberculata* (Gastropoda: Haliotidae) from the NW of Spain. *Disease of Aquatic Organisms*, **71**(3), 233-7.
- Bally, M. and 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.
- Balseiro, P., Aranguren, R., Gestal, C., Novoa, B. and Figueras, A. (2006). Candidatus *Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**(1-4), 63-72.
- Bancroft, A. and Stevens, J. D. (1982). Theory and practice of histological techniques. New-York, Churchill Livingstone.
- Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R. J. and Rosenberg, E. (2003). Superoxyde Dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Current Microbiology*, **46**, 418-422.
- Barkai, R. and Griffiths, C. L. (1988). An energy budget for the south african aalon *Haliotis midae*. *Journal of Molluscan studies* **54**, 43-51.
- Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M. and Rosenberg, E. (2003). Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(7), 4236-4242.
- Cheng, W., Hsiao, I. S., Hsu, C. H. and Chen, J. C. (2004). Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, **17**(3), 235-43.
- Chu, F.-L. E. (2000). Defense mechanisms of marine bivalves. Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and pathology. M. Fingerma and R. Nagabhushanam. Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, Sciences publishers: 1-42.
- Colquhoun, D. J. and Sorum, H. (2001). Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*. *Microbial Pathogenesis*, **31**(5), 213-219.
- Comeau, A. M. and Suttle, C. A. (2007). Distribution, genetic richness and phage sensitivity of *Vibrio* spp. from coastal British Columbia. *Environmental Microbiology*, **9**(7), 1790-800.

- Conejero, M. J. and Hedreyda, C. T. (2003). Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection. *Journal of Applied Microbiology*, **95**(3), 602-11.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., *et al.* (2007). Characterization of physiological and immunological differences between Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **353**(45-57).
- Dridri, S., Romdhane, M. S. and Elcafsi, M. (2007). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*, **263**, 238–248.
- Esnault, S. and Barraer, F. (2005). Etude chronologique des températures de la mer sur l'ouest de la France. Rapport Université de Bretagne Sud.
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H. and Renault, T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol*, **20**(4), 536-47.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Fauray, N., Kerdudou, N., Le Moine, O. and Renault, T. (2007). Analysis of hemocyte parameters in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field — Comparison of hatchery diploids and diploids from natural beds. *aquaculture*, **264**(449–456).
- Gauger, E. J. and Gomez-Chiarri, M. (2002). 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Disease of Aquatic Organisms*, **52**(1), 39-46.
- Goarant, C., Herlin, J., Brizard, R., Marteau, A. L., Martin, C. and Martin, B. (2000). Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Disease of Aquatic Organisms*, **40**(2), 101-7.
- Gonzalez-Acosta, B., Bashan, Y., Hernandez-Saavedra, N. Y., *et al.* (2006). Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. *FEMS Microbiology Ecology* **55**, 311-321.
- Gruenthal, K. M. and Burton, R. S. (2008). Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis cracherodii* Leach, 1814), a candidate for endangered species status. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **355**(1), 47-58.
- Harris, L., Owens, L. and Smith, S. (1996). A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(9), 3548-50.
- Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A. P., Ostfeld, R. S. and Samuel, M. D. (2002). Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Sciences*, **296**(2158-2162).
- Hayashi, I. (1983). Seasonal changes in condition factors and in the C/N ration of the foot of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association, U.K.*, **63**, 85-95.
- Hobday, A. J., Tegner, M. J. and Haaker, P. L. (2001). Over-exploitation of a broadcast spawning marine invertebrate: Decline of the white abalone. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **10**(4), 493-514.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J. and Benkendorff, K. (2007). Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology*, **22**(4), 363-79.
- Huchette, S. M. H. and Clavier, J. (2004). Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *Journal of Shellfish Research*, **23**(4), 951-55.
- Jamieson, G. S. (1993). Marine invertebrate fisheries: evaluation of fisheries over-exploitation concerns. *American Zoologist*, **33**(551–567).
- Johnston, M. D. and Brown, M. H. (2002). An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. *Journal of Applied Microbiology*, **92**(6), 1066-77.
- Kalmbach, S., Manz, W. and Szewzyk, U. (1997). Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(11), 4164-70.
- Koren, O. and Rosenberg, E. (2006). Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(8), 5254-9.
- Lawrence, A. J. and Soame, J. M. (2004). The effects of climate change on the reproduction of coastal invertebrates. *Ibis*, **146**(Suppl.1), 29–39.
- Lee, K. K., Liu, P. C., Chen, Y. C. and Huang, C. Y. (2001). The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *Journal of Thermal Biology* **26**, 585–587.
- Lee, K. K., Liu, P. C. and Chuang, W. H. (2002). Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology (NY)*, **4**(3), 267-77.
- Li, Y., Qin, J. G., Abbott, C. A., Li, X. and Benkendorff, K. (2007). Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **293**(6), R2353-62.

- Lin, C., Yu, R. C. and Chou, C. C. (2004). Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. *International Journal of Food Microbiology*, **92**(2), 207-15.
- Liu, P. C., Lee, K. K., Yii, K. C., Kou, G. H. and Chen, S. N. (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology*, **33**(2), 129-32.
- Liu, S., Jiang, X., Hu, X., Gong, J., Hwang, H. and Mai, K. (2004). Effects of temperature on non-specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). *Aquaculture research*, **35**, 678-682.
- Lopez, L. L. M. and Tyler, P. (2000). Effect of formulated diets, fresh seaweed and temperature on growth rates, gonad development and shell formation of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Journal of Shellfish Research*, **19**(1), 523.
- Malham, S., Lacoste, A., Gelebart, F., Cuff, A. and Poulet, S. (2003). Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology A Comparative and Experimental Biology*, **295**(2), 136-44.
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G. P. and Marin, M. G. (2007). Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol*, **22**(1-2), 98-114.
- Myers, R. and Worm, B. (2003). Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature*, **423**, 280-283.
- Nicolas, J. L., Basuyaux, O., Mazurie, J. and Thebault, A. (2002). *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **50**(1), 35-43.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T. and Wakabayashi. (1998). *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathology*, **33**, 495-502.
- Paillard, C., Leroux, F. and Borrego, J. J. (2004a). Bacterial Disease in marine Bivalves: Review of recent studies. Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, **17**(477-498).
- Paillard, C., Allam, B. and Oubella, R. (2004b). Effect of temperature on defense parameters in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with *Vibrio tapetis*. *Disease of Aquatic Organisms*, **59**(3), 249-262.
- Perdue J.A., J.H. Beattie and K.K. Chew (1981). Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *C. gigas* in Washington State. *Journal of Shellfish Research*, **1**(1):9-16.
- Pouvreau, S., Enriquez-Diaz, M., Le Souchu, P. C., J.P., et al. (2003). Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas*: experimental approach. *Journal of shellfish research*, **22**, 351.
- Przeslawski, R., Davis, A. R. and Benkendorff, K. (2005). Synergistic effects associated with climate change and the development of rocky shore molluscs. *Global Change Biology*, **11**, 515-522.
- Pujalte, M. J., Ortigosa, M., Macian, M. C. and Garay, E. (1999). Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Int. Microbiology*, 259-266.
- Raghunath, P., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. (2007). Evaluation of an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe for detection and enumeration of vibrio spp. from shrimp hatchery environment. *Mol Cell Probes*, **21**(4), 312-5.
- Rothaus, D. P., Sizemore, R. E., Rohela, T., Ulrich, M. J. and Friedman, C. S. (2004). Trends in pinto abalone *Haliotis kamtschatkana* abundance at ten sites in the San Juan Islands and management of the species in Washington State. *Journal of Shellfish Research*, **23**(1), 309-315.
- Royer, J., Ropert, M. and Costil, K. (2007). Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Normandy (France) *Journal of Shellfish Research*, **26**(4), 973-984
- Samain, J. F., Dégremont, L., Soletchnik, P., et al. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, **268**(227-243).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sobhon, P., Apisawetakana, S., Chanpooa, M., et al. (1999). Classification of Germ Cells, Reproductive Cycle and Maturation of Gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *ScienceAsia* **25** (3-21).
- Stabili, L., Acquaviva, M. I. and Cavallo, R. A. (2005). *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). *Water Research*, **39**, 469-477.
- Stahli, A., Schaerer, R., Hoelzle, K. and Ribí, G. (2008). Temperature induced disease in the starfish *Astropecten jonstoni*. *JMBA2 - Biodiversity Records*,
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X.-H., Wang, R., Guo, Q. and Dong, Y. (2008). Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiology and Ecology*, **64**(1), 37-44.
- Thompson, F. L., Iida, T. and Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**(3), 403-31.

- Toren, A., Landau, L., Kushmaro, A., Loya, Y. and Rosenberg, E. (1998). Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(4), 1379-1384.
- Vilchis, L. I., Tegner, M. J., Moore, J. D., Friedman, C. S., Riser, K. L., Robbins, T. T. and Dayton, P. K. (2005). Ocean warming effects on growth, reproduction and survivorship of southern california ablone. *Ecological applications*, **15**(2), 469-480.
- Ward, J. R., Rypien, K. L., Bruno, J. F., *et al.* (2006). Coral diversity and disease in Mexico. *Disease of Aquatic Organisms*, **69**(1), 23-31.

Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection

Article 2 : Soumis à FEMS Microbiology Ecology

Marie-Agnès Travers^{1,2}, Annaïck Barbou², Nelly Le Goïc², Sylvain Huchette¹, Christine Paillard² and Marcel Koken^{2*}

1 France Haliotis, Kerazan, Lilia, 29880 Plouguerneau, France

2 Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin, CNRS UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

ABSTRACT

Vibrio harveyi is a bacterial marine pathogen that can cause fatal disease in a large range of vertebrates and invertebrates, among which the commercially important marine gastropod, *Haliotis tuberculata*. Since 1997 strains of this bacterium cause regularly high mortalities in farmed and wild abalone populations. The way the pathogen enters into abalone and the disease transmission mechanisms are thus far unknown. Therefore, a pathogenic strain, ORM4, was GFP-tagged and validated both for its growth characteristics and virulence as genuine model for abalone disease. The strain permits *V. harveyi* quantification by flow cytometry in seawater and in abalone haemolymph as well as the *in situ* detection of the parasite inside abalone tissues.

* Corresponding author. E-Mail: marcel.koken@univ-brest.fr
Tel: +332 98 49 88 36
Fax: +332 98 49 86 45

[†] *M.K. and C.P. should be considered as last co-authors*

Running title: GFP-tagged *V. harveyi* model strain for abalone disease

Keywords: vibriosis, flow cytometry, *Haliotis tuberculata*, disease, mollusc

INTRODUCTION

The last twenty years, many economically important marine organisms in Europe are affected by an ever-growing number of pathologies. A large part of these emerging diseases which paralyse European aquaculture are caused by *Vibrio* bacteria (Paillard, *et al.*, 2004). Since 1997, one of these, *Vibrio harveyi*, is regularly described as attacking French farm and field stocks of the European abalone, *Haliotis tuberculata*, causing up to 80% of mortalities within a few days. Although this marine gastropod of high commercial value is present in the eastern Atlantic from the Channel Islands in the north to the Senegal coasts in the south, the disease is so far only found in French waters. *V. harveyi* (synonym of *V. carchariae*) (Nicolas, *et al.*, 2002), is a widespread marine pathogen of which several

strains are already known to cause fatal disease in both fish and crustaceans (Austin & Zhang, 2006). To avoid infesting other abalone stocks around the world, both the cellular and molecular disease mechanisms of this particular *V. harveyi* strain, named ORM4, should be elucidated in detail.

Recently, this abalone vibriosis was shown, both in laboratory experiments and in field surveys, to be directly controlled by seawater temperature, and the absolute bacterial concentrations in the direct neighbourhood of the animals seems also of importance for successful infection (Travers, *et al.*, Submitted a). This opportunistic pathogen successfully invades its host only during the abalone summer spawning period when energy reserves are limited and immune systems partially depressed (Travers, *et al.*, Submitted b). However, how the pathogen enters into its host and the ways that disease transmission occurs are both still unknown.

Combining “Green Fluorescent Protein” (GFP)–expression cassettes with the development of plasmids which are stably retained in *Vibrios* without any antibiotic selection (Dunn, *et al.*; 2006; Sawabe, *et al.*, 2006), has recently led to the comprehension of disease dynamics in fish (O’Toole, *et al.*, 2004), of *V. fischeri* symbiosis establishment in squid (Nyholm, *et al.*, 2000) and bacterial dynamics with filter-feeding oyster (Cabello, *et al.*, 2005). To begin unravelling the cellular and molecular disease mechanisms, we engineered a GFP-tagged *V. harveyi* ORM4, which can easily be followed by flow cytometry or epifluorescence microscopy. By comparing growth rates, plasmid retention and in vivo virulence, this GFP-bacterium was found to represent a genuine model for the pathogenic parental strain. Subsequently, the fate of *V. harveyi* ORM4-GFP in contact with abalone, and its capacity to proliferate within these animals or in the surrounding water was investigated. This allowed us to detect the pathogen in moribund abalone tissues and to monitor bacterial concentration variations in seawater and haemolymph which led us to suggest three disease progression phases for this abalone.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains – *Escherichia coli* CC118 λ pir (conjugative helper strain) (Stabb & Ruby, 2002), *E. coli* strain DH5 α carrying GFP-expression plasmid pVSV102 (Dunn, *et al.*, 2006) and *V. harveyi* strain ORM4 isolated from moribund abalone (Nicolas, *et al.*, 2002) and the GFP expressing derivative, ORM4-GFP. Bacterial concentrations were calculated by optical density measurements at 490nm according to the following formula: $OD = 6.10^9 CFU + 2.10^8$. The OD - CFU correlation was estimated by bacterial plating.

Abalone specimens – 150 juveniles of *Haliotis tuberculata* were transferred from the “France Haliotis” hatchery (Plouguerneau, France) to the LEMAR laboratory in June 2006 (24.5 mm \pm 1.5) and 90 in January 2008 (42.5 mm \pm 1.0) and laboratory acclimated in 50L polyethylene tanks with an open seawater circuit at 14-15°C under continuous aeration. During the acclimation period, animals were fed ad libitum on a mixed marine algae diet of *Gracilaria* sp, *Laminaria digitata* and *Palmaria palmata*. Two weeks prior to experimentation, abalone were transferred into 5 L or 30 L experimental tanks with 19°C stagnant seawater. Seawater was aerated, totally renewed each day and its temperature was continuously surveyed. This daily total water renewal is obligatory for the survival of abalone in small laboratory tanks. Experiments were done in triplicate on groups of 20 abalone.

DNA transfer and selection of GFP-tagged *Vibrio* – The pVSV102 plasmid (Dunn, *et al.*, 2006) harbouring GFP and kanamycin-resistance expression cassettes was transferred from *E. coli* to *V. harveyi* ORM4 by triparental mating (Stabb & Ruby, 2002) using the conjugative helper strain CC118 λ pir as described by Dunn *et al.* (Dunn, *et al.*, 2006).

In short, donor, helper and receptor cells were grown overnight to stationary phase in LB (*E. coli* strains) and LBS (LB complemented with salt, NaCl 20 g.L⁻¹ (f.c.) for *V. harveyi*) with an addition of 40 μ g. mL⁻¹ kanamycin for DH5 α -pVSV102. 100 μ l of each culture was combined in a microfuge tube, washed in LBS without antibiotics, and re-suspended into 10 μ l of LBS. This small volume was dropped on a fresh LBS agar plate and incubated overnight at 28°C. The next day the bacterial “spot” was re-suspended into 800 μ l of LBS, serially diluted, plated on LBS plates containing 100 μ g. mL⁻¹ kanamycin and incubated at 18°C. Donor bacteria were counter-selected by growth at 18°C whereas “empty” acceptor and helper strains were killed by the kanamycin selection. Unluckily, the *V. harveyi*

strain ORM4 is not bioluminescent like many other *V. harveyi* strains, and this feature could thus not be used for positive selection. Therefore green fluorescent colonies were detected under UV illumination after two days at 18°C and each fluorescent colony was tested by epifluorescence microscopy to verify whether we were dealing with bona-fide GFP-expressing and most importantly moving (flagella-baring) bacteria. Surviving *E. coli* donor cells were unable to swim as they lack flagella, in contrast to the Vibrionaceae.

Estimation of conservation of GFP expression – One fluorescent colony was grown overnight at 28°C with 100 µg. mL⁻¹ kanamycin to ensure 100% plasmid conservation. This stationary culture was diluted in LBS without antibiotics and grown at 28°C overnight. Every day a new culture was started with an aliquot of the previous day's culture, which was plated, after dilution in Filtered and Sterile Seawater (FSSW), on agar LBS to verify the number of fluorescent over non-fluorescent colonies. Fluorescent CFUs were counted 48 hours later, by optical observation under UV light. The percentage of bacteria that expressed GFP was calculated after each of the 16 “passages”.

Growth curves of GFP-tagged *Vibrios* – To verify eventual growth differences between the parental ORM4 and derivative ORM4-GFP, proliferation of both strains at 28°C was compared by regular measurements of the culture's optical density at 490 nm (Mithras LB940, Berthold technologies) over time, in three independent experiments.

Bacterial immersion and injection challenges – *V. harveyi* ORM4 or *V. harveyi* ORM4 – GFP bacteria, grown overnight in LBS at 28°C, were washed twice FSSW. For the comparison between parental and GFP expressing strains, the seawater in 5 L containers at 19°C, containing 20 juvenile abalone (in triplicate), was inoculated with 10⁵ CFU. mL⁻¹ (f.c) of these bacteria for 24 hr before complete seawater change. Twice a day, dead abalone were counted and removed for analysis. For the bacterial survey in seawater and moribund abalone, the seawater of 30 L tanks containing 20 abalone (in duplicate) was inoculated with 10⁵ CFU. mL⁻¹ (f.c) following the same protocol. For injection challenges, 10⁴ bacteria in 50µl FSSW were injected intramuscularly into 5% ethanol-anaesthetized animals

Bacterial quantification in seawater and abalone fluids by flow cytometry – Bacterial standard curves (estimated by optical density and checked by plating) ranging from 10¹ to 10⁷ ORM4-GFP. mL⁻¹ were prepared in FSSW as well as in 0.5 µm filtered seawater in which “control” abalone had lived. These were analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm laser. Total fluorescent bacterial counts were assessed by counting in low rate at least 10,000 events or accumulating events during 3 minutes. Fluorescent bacteria were identified by their fluorescent peak (FL-1) and their relative size (FSC) and complexity (SSC). No differences between the FSSW and “natural seawater” standard curves could be detected. All samples were filtered through a 80 µm nylon mesh to remove debris and aggregates before flow cytometry analysis

With the settings determined on these standard curves, three independent samples of seawater surrounding the abalone (duplicate tanks) during the bacterial challenges were analyzed after 1, 6, 12 and 24 hours, and subsequently twice a day during the experiment.

Fluorescent ORM4-GFP present in the haemolymph of moribund abalone was quantified both by flow cytometry and bacterial plating.

Microscopic observation of bacteria in tissues and fluids of moribund abalone

Haemolymph was withdrawn from the cephalic sinus of moribund abalone (fallen animals that keep muscular reactivity) and different organs were dissected “aseptically”: gills, gonads, digestive gland, and muscle.

To verify the presence of ORM4-GFP in the tissues of moribund animals, small pieces of the organs were also directly “crushed” between two microscopy slides and examined with an inversed fluorescent Leica DM-IRB microscope equipped with a Retiga 2000R Fast 1394 CC camera (QImaging) and Image-Pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics).

RESULTS

Validation of GFP-tagged *V. harveyi* ORM4 as completely equivalent to wild-type ORM4

To allow us the use of the GFP-transformed ORM4 as a genuine model for wild-type ORM4, the growth characteristics of the two strains were compared. As can be seen in Fig. 1A, no obvious differences with the wild-type strain were observed *in vitro* when grown in liquid LBS medium. Also no noticeable differences could be observed in colony size or colony aspect when plated on LBS or TCBS agar-plates (not shown). To ensure that the GFP-encoding plasmid was stably retained under non-selective growth, ORM4-GFP was cultured during 16 days, with daily re-inoculations of fresh medium. This feature was important to ensure that most of the bacteria retained fluorescence during infection experiments (5-7 days). After seven days of non-selective culture, around 80% of bacteria had kept their high fluorescence, and 12 days of continuous culture were needed before counting less than 20% GFP-expressing bacteria (Figure 1B). To compare the virulence status of GFP-tagged *V. harveyi* with that of the wild-type strain, *in vivo* bacterial immersion challenges were performed. No differences could be found in mortality rate after inoculation of 5 L tanks with either of the *V. harveyi* strains. Both strains lead to 85% abalone mortality in 5 days (Figure 1C). Similar results were also obtained by direct intramuscular injections, which lead to 100% death within 4 days with as little as 10^4 cells of either strain per animal (Not shown).

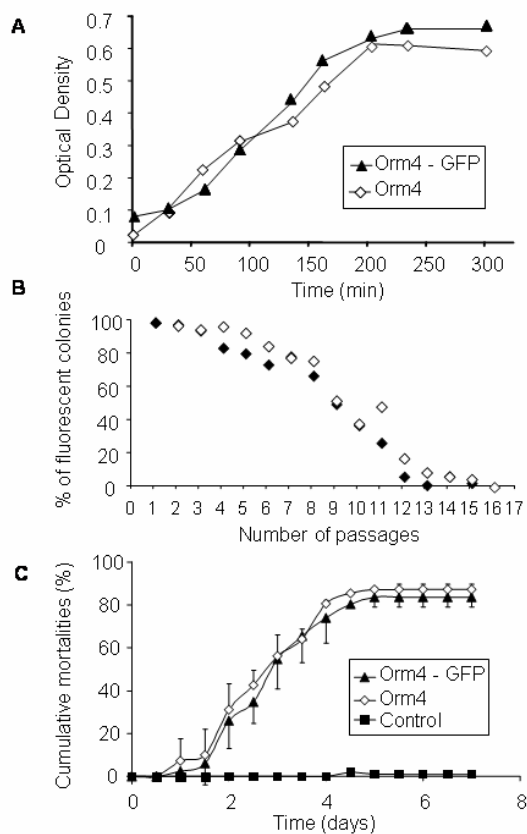


Figure 1: Comparison of growth capacities (A) and virulence (B) between *V. harveyi* ORM4 and GFP-tagged ORM4. (C) Plasmid retention in *V. harveyi* ORM4-GFP. (A) Growth in LBS was estimated by continuous optical density measurements. A representative growth curve out of three independent experiments is given. (B) Plasmid stability (i.e. fluorescence conservation) is estimated by calculating the relative number of fluorescent CFU during a 16 days culture follow-up in non-selective LBS medium with daily dilutions and medium changes. The results of two independent experiments (white and black diamonds) are shown. (C) Virulence toward young abalone was estimated after an immersion challenge with 10^5 bacteria/mL during 24 h in 5L tanks. After the infection phase, the seawater was totally renewed each day. Dead abalone were counted and removed for analysis on a daily basis. The control group consisted of non-infected abalone.

Quantification of GFP-tagged *V. harveyi* by flow-cytometry

GFP-tagged *V. harveyi* were identified by flow cytometry through their intrinsic green fluorescence emission (FL1). A density plot of GFP green fluorescence against side scatter light (SSC representing complexity) was used to set the gate through which particles were identified as being *V. harveyi* on the FSC (representing size) – SSC plot (Figure 2A). The linear correlation between calculated ORM4 and concentration standard of ORM4-GFP in $0.5 \mu\text{m}$ filtered seawater in which abalone had lived, determined by flow cytometry, is similar to that in FSSW and represented by the equation ($y = 0.96 x$,

$R^2 = 0.997$). This bacterial concentration standard allowed to determine the sensitivity of the flow cytometer and to ensure linearity. The sensitivity threshold was fixed to 10^3 bacteria. mL^{-1} (Figure 2B), and thus counts corresponding to less than 10^3 bacteria. mL^{-1} were not considered further. All the dilutions were verified by bacterial plating and a complete concordance between the numbers obtained by optical density, by flow cytometry and the plating method was found down till the 10^3 flow cytometry limit.

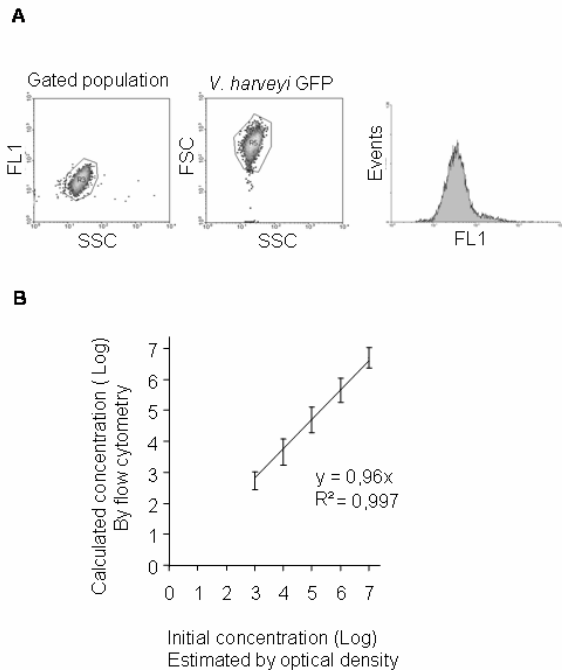


Figure 2: Detection by flow cytometry of GFP-tagged *V. harveyi*. (A) Flow cytometer output of seawater inoculated with ORM4-GFP. Side scatter (SSC), green fluorescence (FL1) and Forward scatter (FSC) properties are shown. (B) Concentration standard of ORM4-GFP in seawater, calculated by optical density, plating and determined by flow cytometry. The linear correlation is represented by the line ($y = 0.96x$, $R^2 = 0.997$). Results are means of triplicates of two independent experiments, and the standard deviations are represented by vertical bars in the figure.

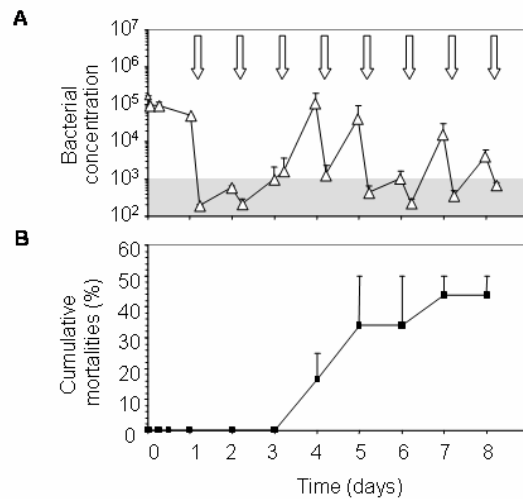


Figure 3: GFP-*V. harveyi* concentrations in seawater surrounding abalone estimated by flow cytometry (A) during a bacterial challenge of abalone in 30L tanks. White arrows correspond to the daily complete seawater changes. (A) Results are means of three water samples from each of the two experimental tanks. Mortality progression is shown in (B) as mean of the cumulative

Bacterial dynamics during abalone challenge

To start determining the *V. harveyi*-GFP infection cycle in its host *H. tuberculata*, abalone and bacteria were placed together in a 30 L closed seawater system for 24 h. During this time, a 68 % reduction in bacterial concentration was observed both by plating and flow cytometry (from 1.6×10^5 bacteria. $\text{mL}^{-1} \pm 0.1 \times 10^5$ to 5.1×10^4 bacteria. $\text{mL}^{-1} \pm 0.2 \times 10^4$). As seawater was changed on a daily basis, bacterial concentrations “fell down” after the first 24 h of immersion to reach concentrations under the flow cytometer-detection threshold (Figure 3A).

Concentration peaks in seawater started to be observed on day 4 ($1.1 \times 10^5 \pm 0.8 \times 10^5$), day 5 ($4.2 \times 10^4 \pm 2.5 \times 10^4$), day 7 ($1.6 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^4$) and day 8 ($4.0 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$), although, the daily seawater renewal eliminated each time the free swimming *V. harveyi*-GFP (Figure 3A).

In parallel to the *V. harveyi*-GFP concentration in the surrounding water, abalone mortalities were recorded. The bacterial challenge led to 44 % of mortalities in 8 days with the first mortalities appearing on day 4 when bacterial concentration peaks became noticeable in seawater (Figure 3B). Please, note that on day 6, no bacterial concentration peak nor mortalities were noticed (see discussion).

In haemolymph of moribund abalone, *V. harveyi*-GFP concentration reached 5×10^8 bacteria. mL^{-1} ($\pm 0.6 \times 10^8$, min 2.9×10^7 , max 1.4×10^9). Haemolymph was also plated to ensure that most bacteria

were fluorescent, and that the fluorescence events counted by flow cytometry corresponded to the total plating counts. Huge concentrations of free swimming fluorescent bacteria were observed by inverse microscopy in haemolymph of moribund abalone (Figure 4C).

In the gills of moribund abalone, *V. harveyi*-GFP was found “fixed onto” the cilia of the epithelial cells (Figure 4A) and the bacteria followed synchronously their movement. In muscle, bacterial clusters were detected which could correspond to haemolymphatic sinuses (Figure 4B). A few bacteria, apparently not associated with a particular region, were also noticed in the digestive gland.

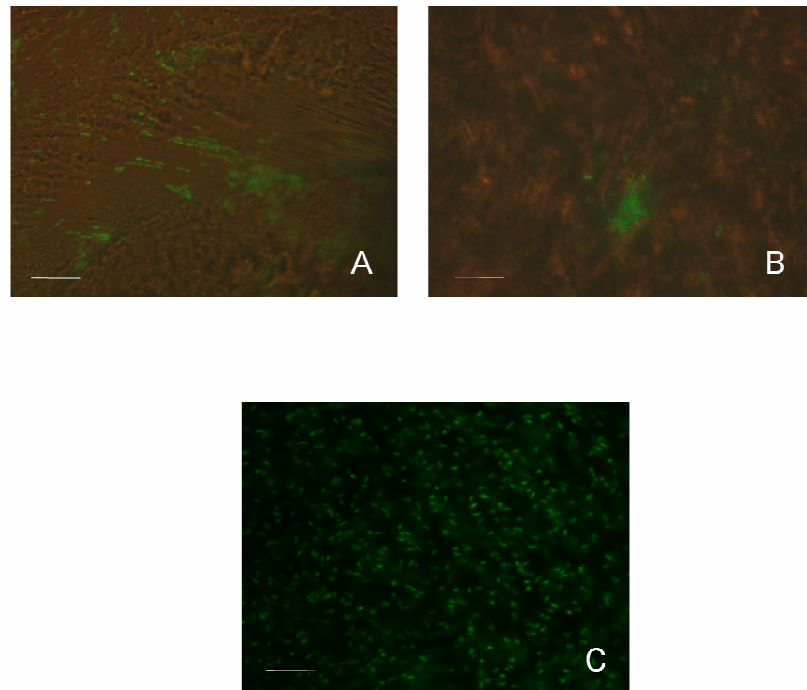


Figure 4: Microscopy observation of tissues from moribund abalone “crushed in-between microscopy slides”. (A) Gills, (B) Muscle and (C) haemolymph. Bars correspond to 10 μm .

DISCUSSION

In this study, we reported the construction and validation of a stable Green Fluorescent protein (GFP)-tagged *V. harveyi* strain, as well as its detection by flow cytometry. By combining a GFP-tagged *V. harveyi* and flow cytometry during abalone infection, we obtained first evidence to propose different disease progression phases for the *V. harveyi* strain ORM4.

Fluorescent molecules combined with flow cytometry are useful tools to explore with single cell resolution, the complex interactions between bacteria and their environment. They can be used to monitor or localize micro-organisms in complex systems, such as host-pathogen interactions (Valdivia & Falkow, 1998). Moreover, unlike other fluorescent detection methods, neither staining nor fluorescent probe addition is required, and samples are therefore analyzed directly without additive manipulation.

GFP is one of the most widely exploited proteins in biochemistry, cellular biology and microbiology. The originally 238 amino acid protein isolated from the jellyfish *Aequoria victoria* emits green light when excited by deep blue light, without requiring neither substrates nor co-factors. GFP is often regarded as a “neutral” protein which doesn’t influence the processes in the cell. It is used in a plethora of articles without doubting this “dogma” and often without verifying whether it possibly changes the cell’s or tissue’s metabolism. For instance, in the case of some *E. coli* and *Pseudomonas putida* strains, it was shown that GFP expression confers to the bacteria an increased susceptibility for certain antibiotics (Allison & Sattenstall, 2007). And in the case of *Salmonella enterica*, Knodler *et al.*

(2005) showed that the production of the fluorescent GFP could affect the ability of the pathogenic bacteria to establish an intracellular niche in epithelial cells and macrophages.

Therefore, to avoid as much as possible adverse effects by GFP expression, we carefully compared our GFP-expressing *V. harveyi* with the non-tagged strain. The results obtained (similar doubling time, no phenotypic changes, good conservation of the plasmid in non-selective media and similar toxicity to abalone), makes us suppose that production of the GFP does not have any detectable impact on the physiology of our GFP-tagged strain.

Infection in abalone with the ORM4 strain probably happens in three phases; (i) A phase of adhesion and/or penetration, corresponding to the decrease of free living bacteria we observed in the first 24 h; (ii) An incubation phase (day 2-3), where bacteria multiply (probably) inside the host without causing any visible effects; and finally (iii) A phase (day 4-8) of acute mortalities where abalone death is accompanied with appearance of huge peaks of free living bacteria.

Note that these bacteria have to originate from moribund or dead abalone as the ORM4 strain is unable to proliferate in seawater alone (data not shown). The absence on day 6 of both moribund abalone and bacterial concentration peaks underlined the cause-effect relationship between dying abalone and the presence of *V. harveyi* in surrounding seawater.

During the infection process, different organs are colonized. In moribund abalone, high concentrations of bacteria are detected in haemolymph (up to 10^9 bacteria.mL⁻¹), and the haemolymphatic sinuses in muscle in moribund abalone. Gill epithelial cells show clear accumulations of OMR4-GFP which seem to be adhered onto their cilia. Cabello *et al.* (2005) showed with a GFP-tagged *V. parahaemolyticus*, that free bacteria in the seawater were actively filtered and retained by the oyster *Tiostrea chilensis*, leading to a decrease of about 85% of free living bacteria in 24 h in the tanks containing living oysters. Therefore, gills are an ideal compartment for adhesion and entrance, as they are in direct contact with the seawater. Moreover, gills are covered with mucus, which could either chemotactically attract or serve as nutrient for the *Vibrios* (Rosenberg & Falkovitz, 2004, Sharon & Rosenberg, 2008).

The haemolymph compartment is frequently targeted by *Vibrios* (Pruzzo, *et al.*, 2005) and for instance, in the salmon and shrimp diseases caused by *V. harveyi* (Austin & Zhang, 2006), the infection always ends up with a fatal septicaemia. Also in our moribund abalone such a terminal septicaemia was observed and haemolymph contained extremely high concentrations of *V. harveyi*: between 5×10^8 bacteria. mL⁻¹ ($\pm 0.6 \times 10^8$) and 1.4×10^9 bacteria. mL⁻¹ as determined by both flow cytometry and plating.

Our new tool permitted a clear detection of some target organs in moribund abalone (gills and haemolymph), but our preliminary data do not allow firm conclusions about the minor localizations, the entrance routes and bacterial tissue progression.

In conclusion, we constructed and validated as genuine model, a GFP-tagged *V. harveyi* strain. This bacterium permitted us to quantify by flow cytometry fluorescent *V. harveyi* concentrations in surrounding seawater, in abalone haemolymph and to visualize it in the tissue during a terminal infection. This GFP-tagged bacterium represents an ideal tool for an in depth study with precise time course experiments and a follow-up of the infection by histology and flow cytometry on tissue homogenates to determine the infiltration routes which pathogenic *V. harveyi* takes to kill its host.

Acknowledgements

Dr. Eric Stabb (Dept. Microbiology, University of Georgia, Athens, USA) is kindly acknowledged for providing us with his excellent *Vibrio* vectors and helper strain. We also thank Florence Buzin for assistance and Raoul Réticámara for imaging. This study was supported by 'France Haliotis' SCEA, and the "Région Bretagne". This is contribution n°XXX of the European Institute for Marine Studies (Brest, France).

References

- Allison DG & Sattenstall MA (2007) The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 318-324.
- Austin B & Zhang XH (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* **43**: 119-124.
- Cabello AE, Espejo RT & Romero J (2005) Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **327**: 157–166.
- Dunn AK, Millikan DS, Adin DM, Bose JL & Stabb EV (2006) New rfp- and pES213-derived tools for analyzing symbiotic *Vibrio fischeri* reveal patterns of infection and lux expression in situ. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 802-810.
- Knodler LA, Bestor A, Ma C, Hansen-Wester I, Hensel M, Vallance BA & Steele-Mortimer O (2005) Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. *Infection and immunity* **73**: 7027-7031.
- Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurie J & Thebault A (2002) *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* **50**: 35-43.
- Nyholm SV, Stabb EV, Ruby EG & McFall-Ngai MJ (2000) Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic vibrios from the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10231-10235.
- O'Toole R, Von Hofsten J, Rosqvist R, Olsson PE & Wolf-Watz H (2004) Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microb Pathog* **37**: 41-46.
- Paillard C, Leroux F & Borrego JJ (2004) Bacterial Disease in marine Bivalves : Review of recent studies. Trends and evolution. *Aquat. Living Res.* **17**: 477-498.
- Pruzzo C, Gallo G & Canesi L (2005) Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ Microbiol* **7**: 761-772.
- Rosenberg E & Falkovitz L (2004) The *Vibrio shiloi*/*Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu Rev Microbiol* **58**: 143-159.
- Sawabe T, Fukui Y & Stabb EV (2006) Simple conjugation and outgrowth procedures for tagging vibrios with GFP, and factors affecting the stable expression of the gfp tag. *Lett Appl Microbiol* **43**: 514-522.
- Sharon G & Rosenberg E (2008) Bacterial Growth on Coral Mucus. *Curr Microbiol*.
- Stabb EV & Ruby EG (2002) RP4-based plasmids for conjugation between *Escherichia coli* and members of the Vibrionaceae. *Methods Enzymol* **358**: 413-426.
- Travers MA, Le Goïc N, Huchette S, Koken M & Paillard C (Submitted) Evidence of an immune depression in spawning period, at the basis of *Haliotis tuberculata* susceptibility to the pathogen *Vibrio harveyi*.
- Travers MA, Basuyaux O, Le Goïc N, Huchette S, Nicolas JL, Koken M & Paillard C (Submitted) Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an exemple of emerging vibriosis linked to global warming.
- Valdivia RH & Falkow S (1998) Flow cytometry and bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **1**: 359-363.

CHAPITRE 2 : Immunité de l'ormeau et sensibilité à *V. harveyi*

V. harveyi est un pathogène qualifié d'opportuniste, qui profite d'une déficience de son hôte pour infecter ce dernier (Austin & Zhang 2006). L'hypothèse d'un lien entre l'état de reproduction des animaux et un certain déficit immunitaire ayant été avancée chez un autre mollusque, l'huître *C. gigas* (Samain & McCombie 2007), ce chapitre s'intéresse aux défenses immunitaires de l'ormeau et vise à comprendre leur modulation, en relation avec l'effort de reproduction et la sensibilité saisonnière des animaux.

Le système immunitaire des ormeaux n'ayant été que très peu étudié, une description des hémocytes, les cellules au cœur des processus immunitaires a été réalisée. Elle a permis de mettre en évidence l'existence de différentes populations cellulaires circulantes. Nous avons pu montrer que, contrairement à la situation des bivalves, très peu de « granulocytes » pouvaient être trouvés et exclusivement par des colorations histologiques. Ni la cytométrie en flux, ni les observations en contraste de phase, ni la microscopie électronique n'ont permis la détection de ces « granulocytes ». La plupart des hémocytes présentaient de larges vacuoles, avec des rosettes de glycogène, des inclusions lipidiques et des compartiments acides. Les hémocytes d'ormeau sont des cellules très actives, capables d'adhérer très rapidement, de phagocyter différents types de particules. Ce travail est la première étape menant à la compréhension du système immunitaire d'*Haliotis tuberculata* en présentant une étude morpho-fonctionnelle de leurs hémocytes ([Article 3](#)).

La deuxième étape a été de comprendre le lien entre la maturation sexuelle, le statut immunitaire des ormeaux et leur sensibilité à *V. harveyi*. Pour cela, un suivi de l'état immunitaire a été réalisé en rade de Brest pendant l'été 2007, et différents paramètres immunitaires ont été enregistrés tels que la taille, la complexité et le nombre d'hémocytes, leur capacité de phagocytose et de production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et différents paramètres enzymatiques et hémolymphatiques. En parallèle, l'état de reproduction des animaux a été suivi et leur susceptibilité à *V. harveyi* testée en laboratoire.

La plupart des paramètres enregistrés montrent des variations saisonnières. De plus, la phagocytose, la production d'EOR, le nombre de cellules circulantes, les activités phénoloxydase (PO) et d'agglutination sont apparues modulées parallèlement à l'effort de reproduction des animaux. En utilisant une analyse globale (analyse en composante

principale), nous avons montré que le statut immunitaire était affecté simultanément avec la maturation et la ponte des animaux. Une corrélation significative a pu être trouvée entre le statut immunitaire et la sensibilité des animaux, ce qui a permis l'établissement d'un lien clair entre état de reproduction, statut immunitaire et sensibilité (Article 4).

Article 3 : Travers, M.A., Da Silva, P. M., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S. M. H., Koken, M. and Paillard, C. (2008). Morphologic, cytometric and functional characterization of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 400-411.

Article 4 : Travers, M.A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M. and Paillard, C. (Soumis à *Fish and Shellfish Immunology*). Seasonal immune-depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection.



Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes

available at www.sciencedirect.com



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



Article 3: Fish and Shellfish Immunology

Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes

Marie-Agnès Travers^{a,*}, Patricia Mirella da Silva^a, Nelly Le Goïc^a,
Dominique Marie^b, Anne Donval^a, Sylvain Huchette^c,
Marcel Koken^{a,1}, Christine Paillard^{a,1}

^a CNRS UMR 6539 "Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin", Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, 29280 Plouzané, France

^b Station Biologique de Roscoff, UMR 7144, CNRS et Université Pierre et Marie Curie, Place G. Teissier, 29682 Roscoff, France

^c France Haliotis SCEA, Lilia Kérazan, 29880 Plouguerneau, France

Received 24 July 2007; accepted 2 October 2007

Available online 9 October 2007

KEYWORDS

Gastropod;
Ormer;
Haemolymph;
Blast-like cells;
Glycogen;
Phagocytosis;
Adhesion;
Flow cytometry

Abstract This work presents the first detailed microscopic and functional analysis of the haemocytes of an abalone; the European *Haliotis tuberculata*. It is shown that in contrast to the situation in bivalves, only very few basophilic "granulocytes" could be found and exclusively with a histological stain. Neither flow cytometry, phase contrast observation nor transmission electron microscopy were able to detect any granular cells. The large majority of cells was constituted of "hyalinocytes", which could be sorted by flow cytometry, for the first time, into small (blast-like) and large cells. This permits a detailed analysis of haemocytes and especially of the lowly represented blast-like cells. The differences in haemolymph cell composition between bivalves and gastropods is reviewed in depth and discussed in view of the new data we present. Most of the abalone haemocytes analysed harbour many vacuoles, large glycogen deposits, lipid inclusions and acidic compartments. However, although the number of these "inclusions" was rather variable in between individual hyalinocytes, these experiments did not allow to discern subpopulations using these criteria, and the population appears more

Abbreviations: AASH, Anti-Aggregant Solution; MAS, Modified Alsever's Solution; FSSW, Filtered and sterile seawater; PBS, Phosphate Buffered Saline; HCM, Haemolymph Cell Monolayer; MGG, May-Grünwald Giemsa; PAS, Positive Acid Schiff; FCM, Flow Cytometry; FSC, Forward Scatter; SSC, Side Scatter; TEM, Transmission Electron Microscopy.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 49 88 18; fax: +33 2 98 49 86 45.

E-mail address: agnestravers@gmail.com (M.-A. Travers).

¹ M.K. and C.P. should be considered as last co-authors.

as a "differentiation continuum". Haemocytes adhere very rapidly and are immunologically active as they quickly phagocytose latex beads and zymozan particles. This study is the first step towards understanding the *H. tuberculata* immune system by adapting new tools to gastropods and in providing a first detailed morpho-functional study of their haemocytes.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Increasing prevalence of bacterial diseases such as vibrioses [1–3] has become an important impairment for the sustainable development of natural and cultured abalone stocks [4]. Investigation into the abalone immune system is becoming very important as only little is known about the cellular immune response of marine gastropods compared to that of bivalve molluscs. Haemocyte characterisation is the first step towards understanding their immune capacity and its potential failure during disease development.

Haemocytes are thought to be involved in many functions, including digestion, metabolite transport [1] and wound and shell repair [5]. However, their most important role resides in internal defence [6] as they are the main immune effector cells. They are responsible for chemotaxis, lectin-mediated pathogen recognition and phagocytosis. They are also implicated in encapsulation or elimination of invaders (reviewed in [6,7]) and are able to produce antimicrobial peptides [8–10].

A number of publications are available on mollusc haemocytes, but controversies still exist about their classification [11] which could, in part, be due to the differences in the methods used. The bivalves haemocyte classification established by Cheng in 1981, in which two main haemocyte types are described [6], is currently generally applied to most mollusc species. Hyalinocytes contain few or no granules, and a round well-centred nucleus, and granulocytes contain granules and an eccentric, round to ovoid nucleus [12]. Cytochemical properties allowed classification of bivalve granulocytes in eosinophils, basophils or neutrophils [13,14]. Functionally, both hyalinocytes and granulocytes can form pseudopodia, aggregate, phagocyte particles and produce reactive oxygen species [15,16]. However, granulocytes were found to be more efficient in the destruction of invading particles [14,17,18].

In gastropods, most studies have been done on the pulmonates *Biomphalaria glabrata* (the intermediate host of *Schistosoma mansoni*) and *Lymnaea stagnalis*. Two haemocyte types (Types I and II) have been described and suggested to correspond to the bivalve granulocyte and blast-like cell types [19,20], even if the authors recognized the difficulty to use the term granulocyte.

The immune response of abalone and especially their haemocyte composition has been poorly studied [21,22]. In 1996 Lebel, describing the effect of vertebrate growth factors on haemocytes in primary culture, divided *H. tuberculata* haemocytes in two categories: adhering fibroblast-like cells and non-adherent epithelial-like cells [21]. However, no proper morphological classification has ever been proposed for *H. tuberculata*, or any other abalone.

Flow cytometry has been applied to study morphologically and functionally bivalve haemocytes [23–28]. This

technique has contributed to improve investigation in this field because of its potential for rapid screening of large amounts of cells and for measuring various immune parameters on a single individual. Here, we present a detailed morphological and functional characterisation of the haemocytes of the abalone *H. tuberculata*.

Material and methods

Animals

Thirty abalone, *Haliotis tuberculata* (60–80 mm shell length) were collected from natural populations in the Bay of Roscoff, Brittany (3°58' W, 48°43' N) in November 2006, and 30 in the Bay of Brest, Brittany (4°33' W, 48°21' N) in February 2007. The animals were acclimatised in the laboratory in 110-L tanks in an open seawater circuit with continuous aeration at 15 ± 2 °C, for at least 2 weeks prior to the experiments. During the acclimation period, animals were fed on a marine macroalgae diet of *Laminaria digitata* and *Palmaria palmata*.

Haemolymph collection

Haemolymph was withdrawn from the cephalic arterial sinus located at the anterior part of the muscle using a 25-gauge needle attached to a 2-ml syringe containing different solutions depending on the procedure (see below). Haemolymph from each abalone was transferred into a vial and kept on ice.

Light microscopy

Fresh and fixed haemocytes

Cells in suspension

A fixed volume of haemolymph was withdrawn into syringes containing an equal volume of either filtered sterilized seawater (FSSW), anti-aggregant solution AASH (1.5% EDTA in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 [29]), Hemofix[®] fixative (Becton Dickinson) or 6% glutaraldehyde solution (in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4). These preparations were immediately observed on a phase contrast microscope (Leica) or a differential interference microscope (Zeiss Apotome) equipped with Nomarsky contrast.

Haemolymph cell monolayers (HCM)

HCMs were prepared in two different ways: cyto-centrifugation or cell adhesion. Haemolymph, for both procedures, was withdrawn directly in a same volume of modified Alsever's solution (MAS, 20.8 g L⁻¹ glucose, 8 g L⁻¹ sodium citrate, 3.36 g L⁻¹ EDTA adjusted with NaCl to 1100 mOsm) [30], washed twice and re-suspended. To

perform spontaneous cell adhesion, 180 μ l of haemocyte solution was set onto a glass slide, mixed with 40 μ l of 20 mM CaCl_2 and allowed to adhere for 20 min at 15 °C. For cyto-centrifugation, 150 μ l of a haemocyte solution (about 5×10^5 cells ml^{-1}) was centrifuged at $100 \times g$ for 5 min.

Haemolymph cell monolayer (HCM) staining

May-Grünwald Giemsa (MGG), Giemsa and Hemacolor[®]
HCMs were fixed with 100% methanol at room temperature for 10 min (Giemsa and MGG) or 2 min (Hemacolor[®], Merck). For Giemsa staining, HCMs were stained during 20 min with a Giemsa solution (Fast Giemsa, Ral, 1:6 in distilled water). For MGG, HCMs were stained first with a May-Grünwald solution (Merck) (1:1 in PBS) during 3 min, following by a Giemsa staining (1:20 in PBS) for 10 min. For Hemacolor[®], HCMs were staining 1 min with each of the two commercial staining solutions. Glass slides were gently washed in distilled water and mounted. Haemocyte dimensions were estimated with Visilog 5.1 software on HCMs prepared by cyto-centrifugation and stained with MGG. The relative percentage of the different haemocyte populations was calculated by analysing 100 cells per abalone (10 animals).

Periodic Acid Schiff (PAS) (carbohydrate detection)

Air dried HCMs prepared by cell adhesion in the presence of CaCl_2 and fixed with methanol during 10 min at room temperature, were stained with a Periodic Acid-Schiff Kit according to the manufacturer's protocol (Sigma). Briefly, HCMs were stained during 10 min with Periodic Acid solution, washed with distilled water, stained with Schiff reagent during 30 min and washed during 20 min in tap water before mounting. For specific detection of glycogen, fixed HCMs were incubated with 0.5% amylase, during 1 h, at room temperature. Pink colouration indicated the presence of glycogen.

Gomori's method (acid phosphatase detection)

HCMs prepared by cell adhesion were fixed in Baker's formol calcium (4% formaldehyde, 2% NaCl, 1% calcium acetate) for 20 min at room temperature. After a wash with tap water slides were incubated in Gomori's solution [19], for 30 min at 37 °C. Slides were washed with distilled water and immersed in a 1% ammonium sulphite solution for 2 min, counterstained with 2% methyl green and mounted. For controls, sodium β -glycerophosphate was omitted from the Gomori's solution. Positive reaction was discerned by black spots inside the cells.

Sudan black B (lipid staining)

HCMs prepared by cell adhesion were fixed with Baker's formol calcium as described above. HCMs were treated with 50% ethanol for 3 min and incubated in a Sudan black B solution (saturated solution in 70% ethanol) for 15 min. Finally HCMs were washed in 50% ethanol and mounted. The presence of lipids was revealed by the presence of a black spot.

Nile red staining (lipid detection)

Haemocytes diluted in AASH or HCMs prepared in the presence of CaCl_2 as described above were washed in FSSW and incubated for 10 min in presence of Nile red

(10 mg L^{-1} , Molecular Probes). Neutral and polar lipids were detected by yellow fluorescence and red fluorescence, respectively.

Neutral red uptake (lysosome staining)

Diluted haemolymph in FSSW (1:4) was deposited onto a glass slide and haemocytes were left to adhere for 20 min at 15 °C. Plasma was removed and neutral red solution (8 mg L^{-1} in FSSW) was added. Slides were incubated for 15 min at 15 °C. Lysosomes were detected by red colouration.

Acridine orange (acid inclusion detection)

HCMs prepared in presence of CaCl_2 as described above were washed in FSSW and incubated with acridine orange (1 $\mu\text{g L}^{-1}$, Sigma) for 10 min. Acid inclusions showed red fluorescence.

Phagocytosis assay

Haemolymph was used to prepare HCMs replicates by cell adhesion in a moist chamber in the presence of seawater or two different particles: (1) fluorescent latex beads (Fluoresbrite YG Microspheres, 2.00 μm , Polysciences, 1:200 in FSSW) and (2) zymoan A (10^7 particles ml^{-1}), i.e. yeast cell walls prepared as previously described [28]. After 30 min of incubation, excess of particles was removed by gently washing twice with FSSW. One HCM replicate of each treatment was incubated with neutral red solution, another with acridine orange solution and the last remained unstained. After 15 min slides were observed.

Transmission electron microscopy (TEM)

Haemolymph (3 specimens) was withdrawn (1:1, v/v) into fixative (6% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer, with 7% saccharose, pH 7.2). After 1 h at 4 °C, haemocytes were pelleted ($1000 \times g$, 10 min, 4 °C), washed in sodium cacodylate buffer (0.2 M, pH 7.2) and postfixed in 1% osmium tetroxide (in 0.2 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2). After 75 min at 4 °C, haemocytes were washed, pelleted and pre-embedded in 1.5% agar at 40 °C immediately followed by centrifugation ($1700 \times g$, 5 min). Small pieces of agar were cut, dehydrated and embedded in Epon. Ultrathin sections were double stained with uranyl acetate (7% in methanol) and lead citrate (250 mg ml^{-1}) and observed with a JEOL 100 CXII electronic transmission microscope.

Flow cytometry (FCM) analysis

Morphological and cell sorting analyses were performed using a FACSAria flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488-nm air-cooled laser. PBS was used as sheath liquid. Functional analyses were done using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm laser and the standard filter setup.

Haemocyte morphology

Haemolymph was withdrawn as described above, diluted either in anti-aggregant AASH or FSSW, or fixed with 4%

paraformaldehyde in MAS. All samples were incubated during 30 min with SYBR Green I fluorescent dye (Molecular Probes) at a 10^{-3} dilution of the commercial stock [26].

Fixed and fresh haemocytes from 5 individuals were sorted. Subpopulations of interest were gated and separated for optical identification, staining and photography.

Adhesion capacity

The adhesion protocol was adapted from Hégaret et al. [27]. Two sub-samples of haemolymph of 5 individuals were diluted (1:4) (a) in FSSW or (b) in anti-aggregant solution AASH, used as a control. Assays were performed at 15 °C in 24-well microplates (Cellstar, Greiner Bio-one). After 0, 5, 10, 15, 30 or 60 min, 3% glutaraldehyde was added and supernatants transferred into flow cytometric tubes and incubated for 1 h in the presence of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ propidium iodide (final concentration) before flow cytometry analysis. The adherence was estimated as the percentage of adhered haemocytes (in presence of FSSW) over total haemocyte count (estimated in anti-aggregant solution).

Phagocytosis assay

The phagocytosis protocol was adapted from Allam et al. [31]. A sub-sample of haemolymph was diluted (1:1) in FSSW and 400 μl of this solution was added to a 24-well plate (Cellstar, Greiner Bio-one). Haemocytes were allowed to adhere for 15 min at 15 °C, and 100 μl of fluorescent beads (as explained above) were added. Control wells received the inhibitor cytochalasin B (final concentration $15 \mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma). After different times of incubation

(0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h), supernatants were removed and trypsin (2.5 mg ml^{-1} in AASH) was added to detach the adherent cells. Plates were maintained under agitation during 10 min and finally AASH was used to stop the reaction by dilution. By FCM, the beads are identified by their green fluorescence on the FL1 detector. The non-ingested particles were easily distinguished from the engulfed ones by their size on a forward scatter (FSC) vs. side scatter (SSC) and a FSC vs. FL1 plot. The phagocytosis index is defined, as previously described [27], as the number of haemocytes phagocytosing three or more beads.

Results

Haemocyte identification and characterisation

Light microscopy

Fresh and fixed haemocytes

After adhesion, fresh abalone haemocytes rapidly displayed many thin pseudopodia (Fig. 1A–C), and most of the cells presented refringent vacuoles in their cytoplasm. The quantity of these organelles was highly variable, ranging from very few to a situation where they completely fill the cytoplasm (Fig. 1B,C). However, when cells were fixed in suspension (Hemofix[®] or glutaraldehyde) these refringent vacuoles became very difficult to discern (Fig. 1D). In fixed preparations two types of cells could easily be distinguished by their size and the nucleus/cytoplasm (N/C) ratio. The majority are large hyalinocytes with a low N/C ratio. The lowly abundant small haemocytes with a high

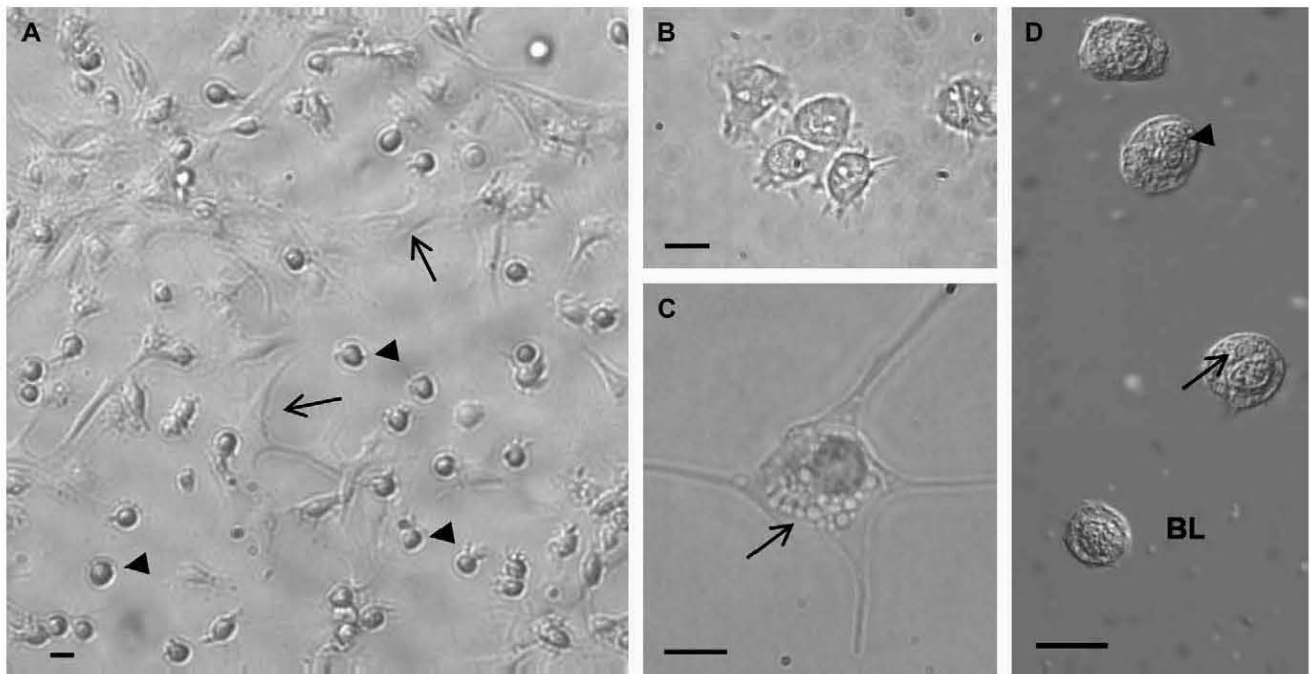


Figure 1 Light micrographs of haemocytes of *Haliotis tuberculata* prepared by spontaneous adhesion using filtered sterilized seawater and observed under phase contrast (A–C) or fixed with glutaraldehyde and observed under Nomarski contrast (D). (A) Haemocytes with various degrees of adhesion, some of them not yet adhering (arrowheads) and others emitting long pseudopodes (arrows). Bar: 10 μm . (B) Haemocytes showing a few refringent vacuoles in their cytoplasm. Bar: 10 μm . (C) High magnification of an adhered haemocyte showing the presence of several refringent vacuoles (arrow). Bar: 5 μm . (D) Fixed haemocytes showing a dense cytoplasm. One vacuole is indicated (arrow) and a lobulated nucleus (arrowhead). BL, blast-like cell. Bar: 10 μm .

N/C ratio most probably represent the blast-like cells characterised in other molluscs (BL, Fig. 1D).

Stained haemocytes

Staining with Giemsa, May–Grünwald-Giemsa or Hemacolor®, of spontaneous adhering or cyto-centrifuged cells, showed two haemocyte types: granulocytes (GR) and hyalinocytes (HY), according to the presence or absence of cytoplasmic granules, respectively (Fig. 2). Granulocytes however were only rarely observed (less than 1% on cyto-centrifuged cells and less than 8% on spontaneously adhered cells). Granulocytes measured 8 to 13 µm and had a low N/C ratio. These cells were round or ovoid in shape, nuclei were centred, round or oval, and generally lobulated (Fig. 2A–C). The cytoplasm contained many blue basophilic granules (Fig. 2A–C). Acidophilic granules, appearing red or pink in these stains, could never be observed. Hyalinocytes composed the major part of the haemocyte population (more than 99% on cyto-centrifuged cells, and more than 92% on spontaneously adhered cells). Two hyalinocyte categories could be distinguished according to their size; small (5–7 µm) and large hyalinocytes (8–12 µm) (Fig. 2B,D). The large cells contained big cytoplasmic vacuoles that did not stain, similar to those observed in living adherent haemocytes (Fig. 2E). Small hyalinocytes had scarce cytoplasm, which gave them a very high N/C ratio. They correspond to the so-called blast-like cells.

Histochemical characterisation

All haemocytes were Sudan black B positive, indicating the presence of lipids (Fig. 3A). With Nile red, a few (1 to 10)

neutral lipid droplets (yellow fluorescence) could be detected in the cytoplasm of the large majority of cells (94%) (Fig. 3B). Polar lipid staining, detected as red fluorescence with Nile red, permitted to discern large unstained vacuoles (Fig. 3C). Most cells (>90%) were PAS stain positive, revealing the presence of glycogen; and only a few cells (including the small blast-like hyalinocytes) were not or only weakly stained (Fig. 3D). Due to their round shape and to the volume occupied in the cytoplasm, the glycogen inclusions observed may correspond to most of the refringent vacuoles observed in fresh slides (Fig. 1) or in Nile red staining (Fig. 3C). Both neutral red uptake which marks lysosomes, and acridine orange detecting acid vesicles and nucleic acids, confirmed the presence of many acidic compartments in the cytoplasm, probably late endosomes and lysosomes (Fig. 3E,F). Small blast-like cells appeared strongly marked with acridine orange (Fig. 3F). The presence of lysosomes in the large majority of the cells was corroborated with acid phosphatase staining (not shown).

Transmission electron microscopy

Due to the large differences in abundance between hyalinocytes and granulocytes, only hyalinocytes were observed by TEM. These haemocytes were characterised by the presence of several long and thin cytoplasmic protrusions or filopodia (Fig. 4B). Note that these cells presented strange bulb-shaped ends at these extensions (Fig. 4B, insert). The nucleus, sometimes lobulated, had an active aspect and the heterochromatin was predominantly arrayed in electron-dense clumps and at the periphery of nucleus (Fig. 4A–C). In the cytoplasm of most cells, the marked

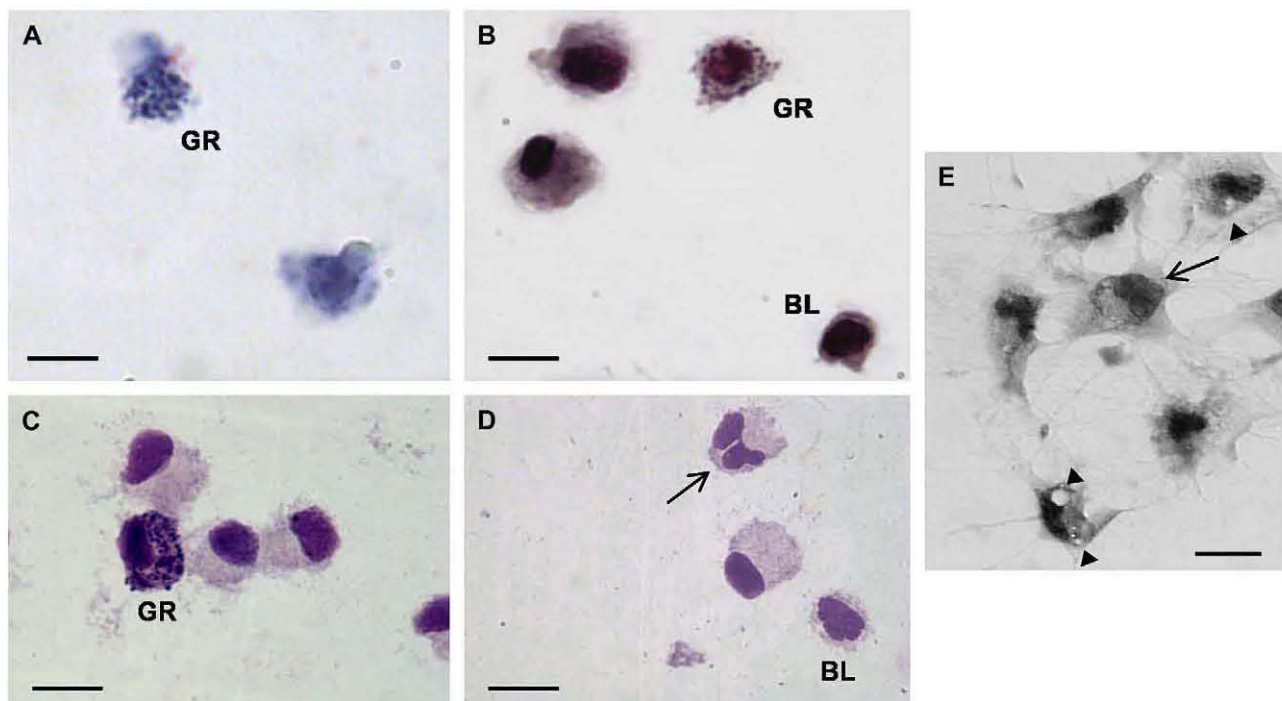


Figure 2 Light micrographs of haemocytes of *H. tuberculata*. Bar: 10 µm. (A) Haemocytes prepared by spontaneous adhesion and stained with Giemsa. (B) Spontaneously adhered haemocytes stained with MGG. (C, D) Cytospined haemocytes stained with MGG; note the bilobulated nucleus (arrow) and blast-like cells (BL). (E) Haemocytes of *H. tuberculata* prepared by spontaneous adhesion and stained with Hemacolor®; note the unstained vacuoles (arrowheads) and the bilobulated nucleus (arrow). GR, granulocytes; BL, blast-like cell, All other cells are large hyalinocytes.

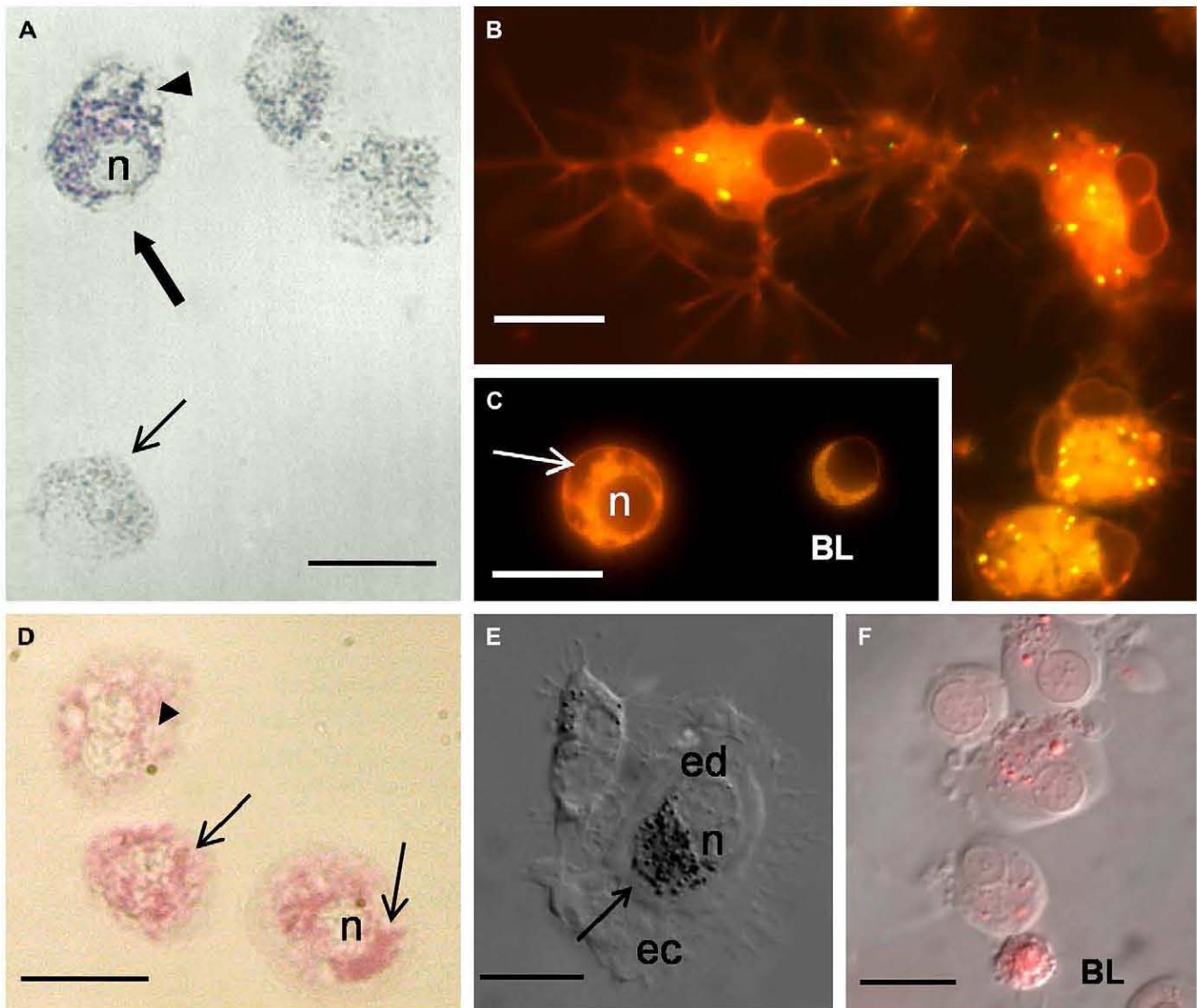


Figure 3 Light and fluorescence micrographs of haemocytes of *H. tuberculata* stained by different techniques. Bar: 10 μm . (A) Sudan black B; note the less intense (arrow) and strong reaction (solid arrow), and unstained vacuoles (arrowheads). (B) Nile red on adherent haemocytes; yellow fluorescent spots denote lipid deposits. (C) Nile red on fixed haemocytes in suspension; note the presence of an unstained compartment. (D) Periodic acid Schiff (PAS); note the intensely stained glycogen deposits near the nucleus (arrows) and unstained vacuoles (arrowhead). (E) Neutral red uptake (arrow) observed by Nomarski; ed, endoplasm; ec, ectoplasm; n, nucleus. (F) Acridine orange staining. BL, blast-like cells; n, nucleus.

characteristic was the presence of huge electron-lucent vacuoles not surrounded by membranes, which sometimes filled most of the cytoplasm (Fig. 4C). These vacuoles corresponded in size and form to the glycogen deposits detected by PAS. Indeed, the presence of rosettes (100 nm in diameter) in TEM corroborated this idea (Fig. 4E). Each preparation showed several mitochondria with many cisternae and a weakly developed endoplasmic reticulum (Fig. 4A,B,D).

Flow cytometry

As previously described [26], SYBR Green I positive cells, revealed in the FL1 detector histogram as a single peak of green fluorescence (emission = 520 nm), are considered as the haemocyte population (Fig. 5A). The absence of

a G2 phase peak (Fig. 5A) indicated the lack of a detectable proliferating state. This population was gated to estimate the number of cells and the population distribution in terms of forward scattering (FSC, size) and side scattering (SSC, granularity, volume) (Fig. 5B). The mean haemocyte concentration measured on 40 individuals was about 6×10^6 cells ml^{-1} (standard deviation 7×10^5).

In fixed samples, and less easily in fresh samples, two populations of differently sized cells but containing the same DNA amount could be detected (Fig. 5A,B). These two populations were sorted by FCM and identified by optical microscopy and MGG colouration and consisted of blast-like cells (10% of total haemocytes, standard deviation 7%, $n = 20$) and large hyalinocytic cells (90% of total haemocytes) (Fig. 5B). The morphological characteristics of

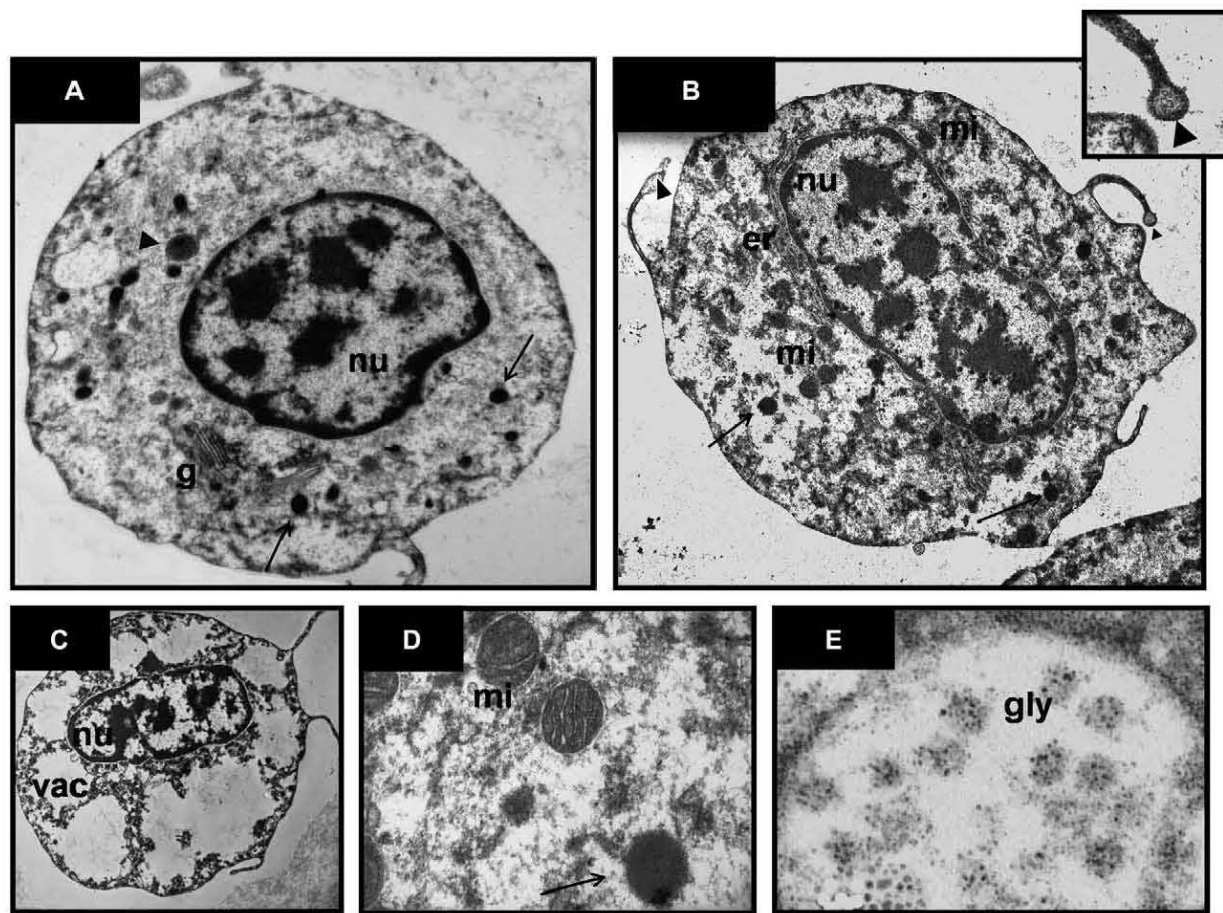


Figure 4 Transmission electronic micrographs of *H. tuberculata* hyalinocytes. (A) Nucleus (nu), electron-dense lipid droplet (arrowhead), Golgi apparatus (g) and lysosomes (arrow) ($\times 5000$). (B) Various organelles: endoplasmic reticulum (er), lysosome (arrow), mitochondria (mi) and nucleus (nu). Filipodia (arrowheads) ($\times 5000$). Magnification of a filopod bulb end ($\times 15,000$). (C) Vacuoles (vac) ($\times 5000$). (D) Detail of mitochondria (mi) and lysosomes (arrow) ($\times 17,000$). (E) Detail of glycogen rosettes (gly) ($\times 10,000$).

these two separated cell populations corroborated those previously found by light microscopy techniques.

Haemocyte functional characterisation

Adhesion—Optical microscopy and FCM

The haemolymph cells of the abalone adhered very quickly on glass or plastic surfaces (Fig. 1A). Flow cytometry analyses permitted to quantify that 58% of the cells adhered within the first 15 min and 87% were fixed after 30 min (Fig. 5C). The small blast-like cells adhered much slower, and the large majority of these cells retained a round non-adherent state.

Phagocytosis—Optical microscopy and FCM

Light microscopy observation and FCM showed that *H. tuberculata* haemocytes were able to engulf both fluorescent latex beads, zymoosan (Fig. 6A,B) and bacteria (not shown). The kinetics of fluorescent beads phagocytosis, estimated as phagocytosis index by FCM, is shown in Fig. 6C. After 30 min, the phagocytosis index was around 34%. This FCM result was verified by microscopy. Thirty percent of the haemocytes incorporated fluorescent latex beads, whereas

65% contained zymoosan particles. Quantification of the number of haemocytes having engulfed 6 or more particles showed a significant difference between beads (9.1%) and zymoosan (35.4%). However, no differences between bead or zymoosan engulfment were observed in cells having incorporated less than 6 particles. Blast-like cells were never seen to engulf any type of particle.

The neutral red and acridine orange staining indicated that zymoosan ingestion was accompanied with lysosome fusion, shown by the red stained endosomes co-localizing with zymoosan particles (Fig. 6A).

Discussion

This paper presents a first detailed analysis of the haemocytes of the abalone *Haliotis tuberculata* by flow cytometry and light and electron microscopy. Abalone haemocytes are composed of mainly two cell types, large and small hyalinocytes. The latter ones were called blast-like cells, because of their high N/C ratio and acid cytoplasm, probably due to the presence of free ribosomes [11]. Both are morphological characteristics of undifferentiated cells [11]. In addition, the

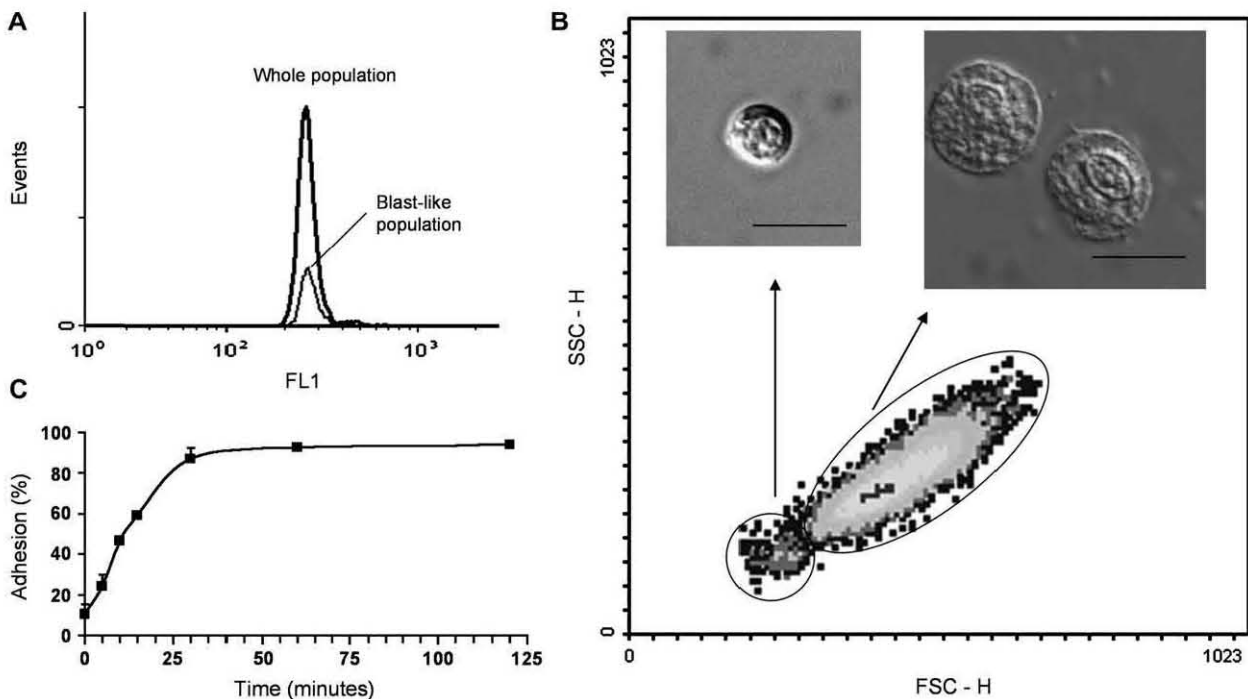


Figure 5 Flow cytometer analysis of fresh haemocytes of *H. tuberculata* stained with SYBR Green I. (A) DNA fluorescence histogram (FL1) for the complete haemocyte population and the blast-like population. (B) Forward scatter (FSC) vs. side scatter (SSC) density plot showing two haemocyte populations after gating on the DNA peak. Nomarski contrast micrographs of the two populations after cell sorting; bar = 10 μ m. Left panel: blast-like cells; right panel: large hyalinocytes. (C) Adhesion capacity (%) in FSSW of haemocytes monitored for 2 h by flow cytometry. Results are expressed as percentage of the control (haemocytes in AASH). Error bar = standard deviation ($n = 5$).

low phagocytic activity and absence of glycogen or lipid deposits indicate the immaturity of the cells [11].

For the first time in a marine gastropod, blast-like cells were discriminated from large hyalinocytes by flow cytometry and cell sorting. This allowed a precise functional and histochemical characterisation of these lowly represented cells. Blast-like cells were already reported in the periwinkle, *Littorina littorea* [32] and in the snails, *Lymnaea truncatula* [33] and *Biomphalaria tenagophila* [19]. In *Tapes philippinarum*, small hyalinocytes had also been proposed as stem cells (blastocytes) due to their morphology and immuno-crossreactivity with an anti-human CD34 antibody identifying haematopoietic cells in mammals [15]. The use of mollusc specific antibodies and gene probes for the identification of haemocyte subpopulations and locations are obligatory steps for adequate immune system analysis in the future [34,35].

In spite of the controversies surrounding the assignation of haemocytes [11], generally two main classes of haemocytes are accepted in bivalves: granulocytes with granules in their cytoplasm and hyalinocytes with few or no granules [6]. Both cell types have been described in clams (*Mya arenaria* [36], *Mercenaria mercenaria* [37], *Ruditapes philippinarum* [15,38], *Ruditapes decussatus* [14], *Meretrix lusoria* [13]), mussels (*Mytilus edulis* [39], *Mytilus galloprovincialis* [40], *Perna perna* [41]), and oysters (*Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* [42], *Crassostrea rhizophorae* [43]). Pectinids were considered for a long time as the only bivalve group that lacked granulocytes [12]; however, recently two

pectinid species, *Argopectens irradians* [44] and *Chlamys farreri* [35], were shown to contain granulocytes. This fact underlines again the difficulty to detect the presence of granules, and to classify haemocytes.

In gastropods, the situation seems different. In pulmonate gastropods like *Biomphalaria glabrata* [20] and *Lymnaea stagnalis* [45] and in the marine gastropod *L. littorea* [32], only a single type of mature cells was described: granular cells in both pulmonates and agranular cells in the marine gastropod. But all authors underlined the difficulty of assuming the term of granulocyte since the typical bivalve granular aspect was not observed [19,20,32]. In contrast, *Haliotis asinina* haemolymph was described (only by TEM) to comprise hyalinocytes and granulocytes [22]. However, in this case, shape and size of the granules (huge rod-shaped electron-dense structures) are completely different from those already observed in the other molluscs species previously described [8]. In the present study, none of these huge structures could be found in more than a hundred cells analysed by TEM. Small basophilic granules could occasionally be observed only using light microscopy stainings, and only in the presence of 6 mM CaCl_2 . Surprisingly, in this study, neither phase contrast microscopy, flow cytometry nor electron microscopy were able to detect these granulocytes.

In bivalves, several authors have described differences in granulocyte percentages obtained between adhered and cyto-centrifuged clam cell preparations, showing more granulocytes in the cyto-centrifuged slides [36,46]. They

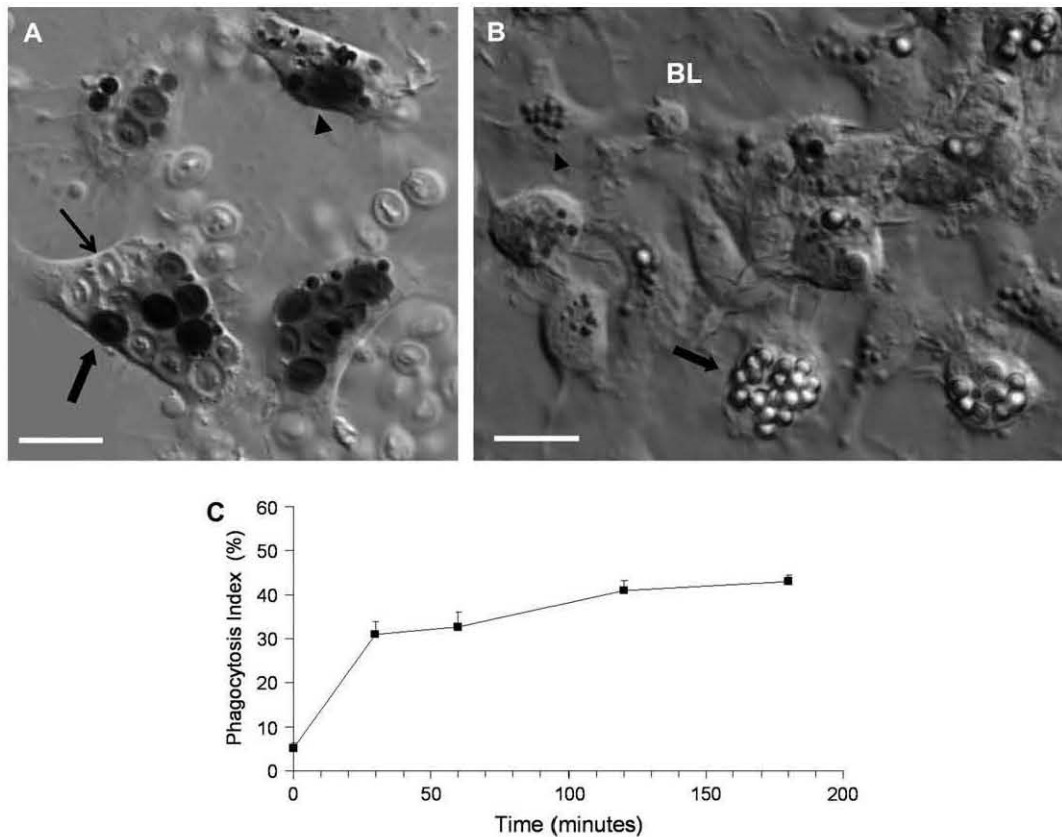


Figure 6 Light micrographs of phagocytosis by haemocytes of *H. tuberculata* observed by Nomarski, and flow cytometry analysis of beads phagocytosis. Bar: 10 μm . (A) Zymozaan within phagocytic vesicles in the cytoplasm of haemocytes (arrow), some of them are fused with lysosomes as demonstrated by neutral red uptake (dark colour). Haemocyte that did not engulf zymozaan (arrowhead). (B) Haemocytes which engulfed more than 10 fluorescent latex beads (solid arrow). Acid vesicles stained with acridine orange (dark colour) in haemocytes that did not engulf any particle (arrowhead) and the absence of this kind of vesicles in a blast-like cell (BL). (C) Phagocytosis index kinetics (haemocytes phagocytosing three or more fluorescent latex beads) monitored during 3 h in FSSW at 15 $^{\circ}\text{C}$.

attributed these differences to differential adhesion capacities of the two haemocyte sub-classes. In the present work, however, more granulocytes were detected in the adherent cell preparations. Therefore, it is not excluded that degranulation of the haemocytes occurs during centrifugation as proposed by Ford [47].

FCM is supposed to discriminate cell populations even in very low proportions, but in our case only two populations could be detected, small and large hyalinocytes. This is in contrast to bivalves where FCM analysis easily detects the granulocytes by differences in side scatter (SSC) [26]. This may be due either to degranulation or to a different composition of the granules making them less refringent and so undetectable by FCM. Degranulation is rather unlikely as fixation occurs almost immediately during bleeding. New protocols in FCM, using different colourations, activity assays or antibodies, should be tuned up to help discriminate haemocyte populations in the future. Some small vesicles were occasionally observed by TEM, which are likely lipid droplets and lysosomes. But their numbers do not correspond to the large amount of granules observed in the occasional granulocytes on Giemsa-stained slides. Thus, although granules could eventually be seen under particular

conditions (Giemsa staining), the majority of techniques used (FCM, TEM and phase contrast microscopy) failed to detect them; therefore, bivalve classification in two main haemocyte types (hyalinocyte and granulocyte) should not be applied for marine gastropods.

One marked characteristic of most haemocytes of *H. tuberculata* was the presence (by light microscopy) of refringent vacuoles in their cytoplasm. Lucent vacuoles resembling those found here were also reported in the very rare vesicular cells from the oyster *Crassostrea gigas* [42,48], the cockle *Cerastoderma edule* [49] and the clam *Mercenaria mercenaria* [46]. The authors suggested a role in storage/transport of nutrients or enzymes for these vacuoles. In the present study, refringent vacuoles corresponded in shape, size and numbers to those stained with PAS. As observed by TEM, they also occasionally contained glycogen rosettes, which led us to conclude that the main compound of these vacuoles is glycogen. Accumulation of glycogen in the cytoplasm of haemocytes was frequently observed in bivalves [6,36,50,51] and gastropods [20,22]. In *Haliotis asinina*, a very large deposit of glycogen in the cytoplasm was also observed by TEM [22]. Similarly, in *Littorina littorea* a wealth of glycogen was noted and the

authors suggested a classification based on the quantity of glycogen deposits, thought to reflect, at least partially, the degree of maturation [32].

By engulfing ^{14}C -labelled bacteria, oyster haemocytes showed much more glycogen derived from bacterial degradation after phagocytosis than from other sources [6,51–53]. Glycogen is the most important short-term storage compound in eukaryotic cells as it is synthesised and broken down more rapidly than lipids. Glycogen quantities stored in the haemocytes differ between mollusc species. This led Gorbuschin and Iakovleva [32] to propose that intertidal animals, which are more subject to hypoxia, obligatorily use the fermentation pathway to generate energy. This metabolism, however, is more demanding in terms of glycogen consumption. Therefore, intertidal animals, like abalone, need to have large and easily accessible energy stocks.

H. tuberculata haemocytes harboured lipids in their cytoplasm, membrane-associated phospholipids (stained with Sudan black B) and neutral lipid droplets (stained by Nile red), which might also correspond to energy storage as observed in *Crassostrea rhizophorae* [43].

In molluscs, the primary sites of haemocyte proliferation are still under discussion [54]. In 1974 Sminia hypothesised the absence of a well-defined haematopoietic organ in the pulmonate gastropod, *Lymnaea stagnalis*, in favour of a disperse connective tissue origin [45]. In 1975 Lie described in *B. glabrata* an amoebocyte producing organ between the pericardium and the posterior epithelium of the mantle cavity and in the blood sinuses of the ventricle [55]. In abalone [7], as well as in bivalves [11] the haematopoietic tissue has yet to be identified.

Different theories have been proposed to explain the origin of haemocyte sub-types. Cheng (1981) and Auffret (1988), based on the observation of granules in some of the blasts, proposed two types of cell precursors which differentiate into granulocytes and hyalinocytes [6,12]. However, Hine [11] recently reviewed those statements and in absence of granuloblasts, suggested a model with only one precursor cell type giving rise to hyalinocytes which matures into granulocytes. Here, granules were also not detected in blast-like cells. Therefore we tend to adhere to the last hypothesis. However, this needs to be confirmed by cell marking techniques or cell culture approaches. Blast-like haemocytes can now be isolated in abalone and will allow *in vitro* experiments and differentiation and proliferation studies.

H. tuberculata large hyalinocytes showed remarkable adhesion and aggregation capacities as 56% of the cells adhere within 15 min to the substratum. This extremely rapid adherence is comparable to that described by Chen [56] for *Mytilus californianus* haemocytes. Abalone haemocytes can also migrate, as shown by migration chamber assays [57]. Both abilities underline their capacity to actively find particles by chemotaxis, the first step of phagocytosis [6,58,59]. Adhesion properties are extremely important for immune surveillance. To underline this, Brown Ring Disease, affecting Manila clam, could be used as a good example: in this disease, the pathogen actively inhibits the haemocyte adhesion [60]. Blast-like cells remained round and "lowly" adhered, and may correspond to the few non-adhered cells observed after 1 h in the adhesion assay, or to the epithelial-like cells previously described in *H. tuberculata* [21].

Phagocytosis is the most important defence mechanism in invertebrates. Haemocytes of molluscs are known to efficiently phagocytose foreign material such as bacteria, protozoans and cell debris. In the present work, latex beads as well as yeast were actively engulfed by 60–80% of the haemocytes. Granulocytes in bivalves are thought to represent the main phagocytic cells [17,27,48,52]. This theory should perhaps be reconsidered in abalone where granulocytes are absent or very under-represented, and phagocytosis is clearly done by hyalinocytes.

As observed in our work, differences in kinetics and phagocytosis indexes between latex beads and zymozan were already reported in *B. glabrata* [61]. Both studies showed a higher phagocytic capacity for zymozan, natural fungus cell walls compared to latex beads. Terahara et al. (2006) showed that the oyster *C. gigas* granulocytes phagocytosed preferentially bacteria and yeast, whereas hyalinocytes engulfed more efficiently latex beads, implicating a different recognition mechanism between these two cell types [48]. Such affinity differences should be verified in our model and could potentially lead to the identification of functional sub-populations.

Phagocytosis is followed by degradation of the ingested particle, which occurs after phagosome and lysosome fusion. Hyalinocytes showed many neutral red and acridine orange-positive cytoplasmic compartments indicating the high number of lysosomes [62]. These organelles showed also a positive staining with Gomori's solution, revealing acid phosphatase activity, mainly present in lysosomes. This study showed the presence of lysosomes in hyalinocytes and their functionality, since phagosome acidification can be seen for zymozan, in the presence of neutral red.

In conclusion, haemolymph of *H. tuberculata* is mainly composed of small (i.e. blast-like) and large hyalinocytes, although some rare basophilic granulocytes could be observed with Giemsa staining. Therefore the situation in gastropods clearly differs from that in bivalves, and the definition of a bivalve granulocyte may not be directly transferred to gastropods. The abalone haemocyte population appears as a gradient of potential maturation stages (as detected for instance by the glycogen deposits). It is conceptually difficult to connect the large amount of functions these cells display with the poor cellular differentiation we can detect thus far. While trying to develop new tools to describe and understand this eventual differentiation, it is in the meanwhile most important to consider the haemocyte not only as an immune cell, but to study in parallel all the haemocyte functions. The tools developed in this study provide a solid basis to investigate environmental and pathological impacts on haemocyte physiology.

Acknowledgements

The authors are grateful to the team of Dr Patrick Cormier for the use of the Apotome microscope. We thank Dr Philippe Soudant for careful revision of the manuscript and stimulating discussions. We are also grateful to Dr Say Panous and Dr Michel Auffret for discussions and to Dr Margherita Barracco for the very helpful suggestions on light and electron microscopy techniques. We are grateful to Alain Le Mercier for image analysis and help with

microscopy. This study was supported by 'France Haliotis' society, and the 'Région Bretagne'.

References

- [1] Cheng W, Juang FM, Chen JC. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish Shellfish Immunol* 2004;16:295–306.
- [2] Liu PC, Chen YC, Huang CY, Lee KK. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 2001;104:71–7.
- [3] Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurie J, Thebault A. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis Aquat Org* 2002;50:35–43.
- [4] Huchette SMH, Clavier J. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *J Shellfish Res* 2004;23:951–5.
- [5] Sparks AK, Morado JF. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. In: Fisher WS, editor. *Disease processes in marine bivalve molluscs*, vol. 18. Bethesda, MD: American Fisheries Society; 1988. p. 139–52.
- [6] Cheng TC. Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowley AF, editors. *Invertebrate blood cells*. London: Academic Press; 1981. p. 233–99.
- [7] Hooper C, Day R, Slocombe R, Handlinger J, Benkendorff K. Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:363–79.
- [8] Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestant B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 2004;198:149–68.
- [9] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, Salzert M, Roch P. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J Biol Chem* 2000;275:12954–62.
- [10] Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett* 2000;486:185–90.
- [11] Hine PM. The inter-relationships of bivalves hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 1999;9:367–85.
- [12] Auffret M. Bivalve hemocyte morphology. In: Fisher WS, editor. *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Bethesda: MD American Fisheries Society; 1988. p. 169–77.
- [13] Chang S-J, Tseng S-M, Chou H-Y. Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: a comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Zool Stud* 2005;44:144–53.
- [14] Lopez C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A. Morphological characterization of the hemocytes of the clam *Ruditapes decussatus*. *J Invertebr Pathol* 1997;69:51–7.
- [15] Cima F, Matozzo V, Marin MG, Ballarin L. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol* 2000;10:677–93.
- [16] Fisher WS. Structure and function of oyster hemocytes. In: Brehelin M, editor. *Immunity in invertebrates*. Berlin: Springer; 1986. p. 25–35.
- [17] Cajaraville M, Pal S. Morphofunctional study of the hemocytes of the bivalves of the mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis of the endolysosomal compartment. *Cell Struct Funct* 1995;20:355–67.
- [18] Pipe RK, Farley SR, Coles JA. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res* 1997;289:537–45.
- [19] Barracco MA, Steil AA, Gargioni R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1993;88:73–83.
- [20] Matricón-Gondran M, Letocart M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* I. Characterization of haemocytes and fixed phagocytes. *J Invertebr Pathol* 1999;74:224–34.
- [21] Lebel JM, Giard W, Favrel P, Boucaud-Camou E. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol Cell* 1996;86:67–72.
- [22] Sahaphong S, Linthong V, Wanichanon C, Riengrojpitak S, Kangwanransan N, Viyanant V, et al. Morphofunctional study of the hemocytes of *Haliotis asinina*. *J Shellfish Res* 2001;20:711–6.
- [23] Allam B, Ashton-Alcox KA, Ford SE. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 2002;13:141–58.
- [24] Ashton-Alcox KA, Ford SE. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue Cell* 1998;30:195–204.
- [25] Fisher WS, Ford SE. Flow cytometry: A tool for cell research in bivalve pathology. In: Fisher WS, editor. *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Bethesda, MD: American Fisheries Society; 1988. p. 286–92.
- [26] Hégarret H, Wikfors GH, Soudant P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation; I. Haemocyte types and morphology. *J Exp Mar Biol Ecol* 2003;293:237–48.
- [27] Hégarret H, Wikfors HG, Soudant P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation; II: Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J Exp Mar Biol Ecol* 2003;293:249–65.
- [28] Lambert C, Soudant P, Choquet G, Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:225–40.
- [29] Auffret M, Oubella R. Cytology and cytometric analysis of bivalve mollusc haemocytes. In: Stolen JS, Fletcher TC, editors. *Techniques in fish immunology. Immunology and pathology of aquatic invertebrates*. Fair Haven, NJ: SOS Publications; 1995. p. 55–64.
- [30] Bachère E, Chagot D, Grizel H. Cell separation by centrifugal elutriation. In: Fisher WS, editor. *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Bethesda, MD: American Fisheries Society; 1988. p. 281–5.
- [31] Allam B, Ashton-Alcox A, Ford SE. Flow cytometric measurement of haemocyte viability and phagocytic activity in the clam, *Ruditapes philippinarum*. *J Shellfish Res* 2002;21:13–9.
- [32] Gorbushin AM, Iakovleva NV. Haemogram of *Littorina littorea*. *J Mar Biol Assoc UK* 2006;86:1175–81.
- [33] Monteil JF, Matricón-Gondran M. Structural and cytochemical study of the hemocytes in normal and trematode-infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitol Res* 1993;79:675–82.
- [34] Barreau-Roumiguère C, Montagnani C, Escoubas JM. Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 2003;27:793–800.
- [35] Jing X, Wenbin Z. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*). *Fish Shellfish Immunol* 2005;19:17–25.
- [36] Huffman JE, Tripp MR. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes. *J Invertebr Pathol* 1982;40:68–74.
- [37] Moore CA, Eble EF. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. *Biol Bull* 1977;152:105–19.
- [38] Oubella R, Maes P, Allam B, Paillard C, Auffret M. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquat Liv Res* 1996;9:137–43.
- [39] Pipe RK. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J* 1990;22:595–603.

- [40] Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis Aquat Org* 1997;29:127–35.
- [41] Barracco MA, Medeiros ID, Moreira FM. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellfish Immunol* 1999;9:387–404.
- [42] Auffret M. Comparative study of the hemocytes of two oyster species: the european flat oyster, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1750) and the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J Shellfish Res* 1989;8:367–73.
- [43] Barth T, Moraes N, Barracco MA. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. *Aquat Liv Res* 2005;18:179–86.
- [44] Zhang W, Wu X, Wang M. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. *Aquaculture* 2006;251:19–32.
- [45] Smínia T. Hematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography. *Cell Tissue Res* 1974;150:443–54.
- [46] Foley DA, Cheng TC. Morphology, hematologic parameters, and behavior of hemolymph cells of the quahog clam *Mercenaria mercenaria*. *Biol Bull* 1974;146:343–56.
- [47] Ford SE, Kanaley SA, Littlewood DTJ. Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J Invertebr Pathol* 1993;61:49–57.
- [48] Terahara K, Takahashi KG, Nakamura A, Osada M, Yoda M, Hiroi T, et al. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 2006;30:667–83.
- [49] Wootton EC, Dyrinda EA, Ratcliffe NA. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:195–210.
- [50] Hawkins WE, Howse HD. Ultrastructure of cardiac hemocytes and related cells in the oyster *Crassostrea virginica*. *Trans Am Microsc Soc* 1982;101:241–52.
- [51] Cheng TC, Cali A. An electron microscope study of the fate of bacteria phagocytosed by granulocytes of *Crassostrea virginica*. *Contemp Topics Immunobiol* 1974;4:25–35.
- [52] Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A. *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 1997;7:403–16.
- [53] Mohandas A, Cheng TC, Cheng JB. Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes: a scanning electron microscope study. *J Invertebr Pathol* 1985;46:189–97.
- [54] Adamowicz A, Bolaczek M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae). *Zool Pol* 2003;48:93–101.
- [55] Lie KJ, Heyneman D, Yau P. The origin of amoebocytes in *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 1975;63:574–86.
- [56] Chen JH, Bayne CJ. Bivalves mollusc hemocyte behaviors: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*). *Biol Bull* 1995;188:255–66.
- [57] Malham S, Lacoste A, Gelebart F, Cuffe A, Poulet S. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *J Exp Zool A* 2003;295:136–44.
- [58] Bachère E, Mialhe E, Noël D, Boulo V, Morvan A, Rodriguez J. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 1995;132:17–32.
- [59] Feng SY. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. In: Fisher WS, editor. *Disease processes in marine bivalve mollusks*. Bethesda, MD: American Fisheries Society; 1988. p. 153–68.
- [60] Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas JL, Paillard C. Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org* 2003;57:109–16.
- [61] Matricon-Gondran M, Letocart M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* II. Different cells have different phagocytic responses to various injected foreign materials. *J Invertebr Pathol* 1999;74:235–47.
- [62] Beaven AE, Paynter KT. Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zymosan. *Biol Bull* 1999;196:26–33.

Seasonal immune-depression associated with increased susceptibility of the european abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection.

Article 4: Soumis à Fish and Shellfish Immunology

Marie-Agnès Travers^{1,2}, Nelly Le Goïc², Sylvain Huchette¹, Marcel Koken^{2γ} and Christine Paillard^{2γ*}.

1 France Haliotis, Kerazan, Lilia, 29880 Plouguerneau, France

2 Laboratoire des sciences de l'environnement marin, CNRS UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

ABSTRACT

Haliotis tuberculata mass mortalities occur in France since 1998 and were attributed to a pathogenic *Vibrio harveyi*. Up to 80% of these mortalities were recorded in September, a month with abalone reproduction and characterized by high seawater temperatures. The importance of gonadal maturation and temperature increase on abalone immunity and susceptibility to *V. harveyi* infection needed to be clarified. Therefore, an immune survey analyzing a large panel of parameters was performed from June to September 2007 on abalone from the Bay of Brest. The data obtained were put in relation with abalone reproductive status and its susceptibility to *V. harveyi*.

Most parameters showed clear seasonal patterns, but during gametogenesis, phagocytosis and phenoloxidase activity were reduced, whereas basal reactive oxygen species production and agglutination titers were significantly increased. Total haemocyte counts went up after the partial spawning event at the end of June, and cell complexity diminished. Using a principal component analysis, the “haemolymph profile” was shown to decrease in parallel with spawning and gonadal maturation processes, and reached a minimum just after total spawning. A significant correlation between this “haemolymph profile” and disease susceptibility allowed us to establish for the first time in abalone, a clear concordance between maturation and spawning processes, immune status and abalone susceptibility to *V. harveyi*.

* Corresponding author. E-Mail: christine.paillard@univ-brest.fr

Tel: +332 98 49 86 50

Fax: +332 98 49 86 45

^γ M.K. and C.P. should be considered as last co-authors

Keywords: vibriosis, mortality, spawning, immunity, phagocytosis

INTRODUCTION

Important mortality outbreaks have been reported in *Haliotis tuberculata* populations since 1998 in Brittany and Normandy (France) [1]. During these epizooties, *Vibrio harveyi*, was isolated and identified as the pathogenic agent [2]. *V. harveyi* is a gram negative bacterium, which was previously described as fish, mollusc and crustacean pathogen in warm seas [3]. The mortalities occurred mainly in September, and killed up to 80% of the estimated stock. The importance of seawater temperature and sexual maturation for field mortalities associated with *V. harveyi* was suggested [1] but the precise

impact of sexual maturation on abalone physiology and particularly on its immune system remained unclear. In oysters and mussels, it was shown that some haemocyte activities (phagocytosis, adhesion) decreased during gametogenesis, suggesting that in these molluscs the immune system is modulated by the reproduction [4-8]. So even though there is some evidence of immune depression in molluscs during their spawning period, a proven link with disease susceptibility is in general lacking.

Mollusc cellular and humoral immunity is thought to depend mainly on the haemocytes present in the haemolymph and in the animal's tissues. These cells are responsible for recognition, phagocytosis and elimination of non-self particles via direct hydrolysis [9], production of reactive oxygen species (ROS) [10], of antimicrobial peptides [11-13] and of non-self recognition molecules and immune effectors (lectins, opsonins and components of the prophenoloxidase system) [14].

Recently, a first detailed analysis of the cellular component of the *H. tuberculata* immune system was undertaken to start unravelling the functioning of its immune system. It was shown that in *H. tuberculata* only two haemocyte types, large hyalinocytes and blast-like cells, exist in contrast to the situation in bivalves where 3 or 4 cell types can be distinguished. [15]. However, the abalone humoral system received very little attention, and only the phenoloxidase, lysozyme and acid phosphatase activities were shown to be modulated by environmental factors (ammonia, nitrite and temperature) [16-20]. So far no information exists on the modulation of abalone immunity during physiological modifications like those encountered during spawning [21].

In the present study, the "haemolymph profile" was assessed by measuring a large panel of haemocyte and serum parameters (haemocyte counts, morphology -size and complexity- and mortality, phagocytosis index, basal ROS production, plasma agglutination titers, superoxide dismutase, phenoloxidase and leucine amino peptidase activities). For the first time, it was tried to correlate immune status to the reproductive status of the abalone and to their susceptibility for their pathogen *V. harveyi*. By studying a large panel of immune parameters linked to a principal component analysis, we were able to prove that abalone develop only disease when high temperatures coincide in time with an immune depression, with the stressful spawning periods and the presence of a pathogenic bacterium.

MATERIAL AND METHODS

I. Animal sampling and temperature survey

From June to September 2007 (June 12th, July 12th, August 2nd, September 4th and 26th) abalone were caught by scuba diving in the Bay of Brest near Tréberon Island. At each dive 34 animals (between 60 and 80 mm) were collected. For each sampling, haemolymph from 10 animals was withdrawn and kept on ice before analysis (described in § III "haemolymph parameters measurement"). The animals were sized, weighted and dissected, as described in § IV "biometry and condition indices, and histological sections". The other 24 abalone were separated into 3 groups of 8 individuals: (a) one group was placed at 19°C and inoculated after 48h with pathogenic *V. harveyi* (see § II "Bacterial challenges") (b) one (control 1) was placed at 19°C and (c) one (control 2) was placed at 17°C.

Temperature probes were placed at the Tréberon Island sampling sites in proximity of a group of abalone, and temperature was registered every hour over a period of four months. Daily means were calculated.

II. Bacterial challenges

Bacterial strain. For the challenge experiment, the virulent *Vibrio harveyi* strain, ORM4, was used. This strain was isolated from diseased *H. tuberculata* in Normandy (France) in 1999 [2]. Bacteria were grown in Luria-Bertani Broth (LB, Sigma) supplemented with extra salt (20g. L⁻¹, f.c) (LBS) in a temperature controlled Infors® shaker at 28°C for 18h before inoculation.

Immersion challenges and susceptibility. Abalone were challenged at 19°C, 48h after capture, in 0.5 µm filtered seawater containing 10⁵ CFU.mL⁻¹ of freshly grown and washed bacteria. Two controls

were used: abalone placed without bacteria at 17°C and 19°C. Seawater was renewed each day and tanks were checked twice a day; moribund or dead animals were removed.

Bacterial identification. Detection of *V. harveyi* was performed on moribund abalone according to the following method. Haemolymph was withdrawn from the cephalic sinus (see § III “haemolymph parameters measurement”), and muscle tissue was homogenized in FSSW (i.e. sterilized and filtered sea water). Tenfold serial dilutions of these extracts were prepared and plated on two different media: Vha (*V. harveyi*-specific medium [22]) and thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose TCBS (vibrio-selective medium), and grown for 24 to 48 h at 28°C. Predominant strains were isolated from TCBS and Vha, and three times streak plated.

Bacterial DNA (liquid culture-propagated) from pure cultures was extracted by the proteinase K/phenol- method [23], and about 10 ng of DNA was used for PCR reactions. A 1500 bp fragment from 16S rDNA was amplified using eubacterial universal primers (forward primer – 5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’ and reverse primer – 5’ CGGYTACCTTGTTACGAC 3’) [24]. A 390 bp fragment of *toxR* DNA was amplified with the *V. harveyi*-specific primers (Vh-*toxR*-F 5’-TTCTGAAGCAGCACTCAC 3’ and Vh-*toxR* R 5’-TCGACTGGTGAAGACTCA 3’) [25]. The fragments were gel-purified and underwent direct sequencing.

III. Haemolymph parameter measurements

Haemolymph collection. Haemolymph was collected from the cephalic arterial sinus with a 5-mL hypodermic syringe (25 G needle) according to Travers et al. [15] and transferred into a 1.5 mL tube maintained on ice until flow cytometry analysis. Total haemocyte count (THC), haemocyte mortality percentages, phagocytosis index, and basal haemocyte reactive oxygen species (ROS) production were assessed (see § IIIA. “Haemocyte parameters measurements”).

For each sample, the remaining haemolymph was used for determining: (1) Phenoloxidase (100 µL) and superoxide dismutase (100 µL) activities as well as total protein content (10 µL). (2) 1 mL was centrifuged at 600 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was divided into 150 µL for determining the agglutination titer and 10 µL for total protein content. The cell pellet was re-suspended in 1 mL of FSSW and divided into 100 µL for the leucine amino peptidase assay and 10 µL for total protein content determination. All samples were quickly frozen and stored at -80°C.

A. Haemocyte parameter measurements

Morphological and functional analyses were performed on a FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm laser.

Total haemocyte count (THC), Morphology and Mortality. 200 µL of haemolymph were diluted into 200 µL of anti-aggregant solution AASH (1.5% EDTA, 6.25 g. L⁻¹ NaCl, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 [26]), and samples were filtered through an 80 µm nylon mesh to eliminate aggregates and debris before flow cytometry analyses. Samples were incubated for 30 min with SYBR Green I fluorescent dye (Molecular Probes, 10⁻³ dilution of the commercial stock solution) and Propidium Iodide fluorescent dye (10 µg. mL⁻¹, f.c.). Only dead cells which lost membrane integrity incorporated propidium iodide and the resulting fluorescence was measured by the FL3 detector. Total haemocyte count (THC) was assessed by counting at least 10,000 particles in 30 seconds. Cells were identified by their characteristic DNA peak (FL1). Results were expressed as cells. mL⁻¹. Haemocyte mortality was presented by giving the percentage of dead cells present in each sample.

Phagocytosis index and phagocytosis capacity. The phagocytosis protocol was adapted from Allam et al. [27]. A sub-sample of haemolymph was diluted (1:1) in FSSW and 400 µL of this solution was added to a 24-wells plate (Cellstar, Greiner Bio-one). Haemocytes were allowed to adhere for 15 min at 18°C, and 100 µL of fluorescent beads (Fluoresbrite YG Microspheres, 2.00 µm, Polysciences, 1:200 in distilled water) were added. After 3 hours at 18°C, supernatants were removed and trypsin

(2.5 mg. mL⁻¹ in AASH) was added to detach the adherent cells. Plates were shaken for 10 min and AASH was used to stop the reaction by dilution. By Flow cytometry, beads are identified through their green fluorescence. Non-ingested particles were easily distinguished from engulfed ones by their size on a FSC (forward scatter, representing particle size) vs SSC (side scatter, representing internal complexity of particles) and a FSC vs FL1 plot. The phagocytosis index is defined, as previously described [28], as the percentage of haemocytes phagocytosing three or more beads.

Reactive oxygen species (ROS) production. The ROS protocol was adapted from Lambert et al. [10]. To avoid inhibitory effects of the anti-adherent and of high cell adhesion in FSSW, ROS production was measured in FSSW exactly 10 min after addition of 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, 0.1 mM f.c.). Results are given as the mean intra-haemocytic fluorescence level of the DCF endproduct expressed in arbitrary units (U.A.) representing the basal ROS production.

B. Enzymatic activity measurements

Phenoloxidase assay. PO-activity was measured according to Ford and Paillard [29]. Briefly, 100 µL of 2mM L-DOPA in 0.2M Tris-HCl pH 8 was added to 100 µL of total haemolymph in 96-well flat-bottomed microtiter plates and the absorbance at 490 nm was read continuously for 15 minutes. One unit of PO activity was defined as the absorbance change of 0.001 in 1 min. Results were expressed as unit activity per mg of protein contained in the sample (U. mg protein⁻¹).

Superoxide Dismutase assay. The SOD activity assay was adapted from Ahmed et al. [30]. Briefly, the activity of 100 µL of total haemolymph was measured in presence of 100 µL of deoxygenated 0.2mM pyrogallol diluted, just before use, in an air-equilibrated Tris cacodylate buffer (0.05M, pH 8.2) containing 1 mM diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA). Inhibition of normal auto-oxidation of pyrogallol in the presence of DTPA by the SOD protein was measured in a continuous read at 405 nm during 1 hour. A standard of purified *Escherichia coli* SOD allowed to express results as Units equivalents of *E. coli* SOD per mg of protein (Ueq. mg protein⁻¹).

Agglutination titer. Agglutination titer was performed as previously described [31]. Horse erythrocytes were purchased from AES laboratory, washed 3 times in PBS and the final pellet was resuspended to give a 2% erythrocyte suspension in TBS (50mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.2). A two-fold serial dilution was prepared with 100µl of cell-free haemolymph supernatants in 96-well U-shaped bottom microplates, using TBS as diluent. This was mixed with 100 µl of the 2% erythrocyte suspension, and plates were incubated at room temperature for 1 h. Agglutination titers were determined by the pattern of erythrocyte sedimentation. Results are expressed as the reciprocal of the highest dilution which showed a positive pattern of agglutination [31].

Leucine Amino Peptidase assay. LAP activity in haemocytes was measured as described by Ford and Paillard [29]. Just after addition of 75 µL of 0.2M TrisHCl pH8 to 100 µL total haemolymph, 25 µL of the substrate (10 mM leucine p-nitroanilide in TrisHCl pH8) was added into a 96-microplate. After mixing, optical density (OD) at 405 nm was measured each 5 minutes during 30 minutes. Results are expressed as OD change per minute per mg of protein (dOD.min⁻¹. mg protein⁻¹). Controls, without haemolymph, but containing leucine p-nitroanilide, TrisHCl and distilled water, were run in parallel and their values were subtracted from the test values.

Total protein content. Protein analysis was carried out on 10 µL samples using the BCA Protein Assay (Biorad) according to the manufacturer's description. Briefly, 200 µL of dye reagent was added to 10 µL of sample, incubated at 37°C for 1 hour and the absorbance was measured at 595 nm. Sample ODs were compared to a standard curve of Bovine Serum Albumin (BSA) and results were expressed as mg of protein. mL⁻¹.

IV. Biometry, condition indexes and histology

In the laboratory, abalone were removed from their shell and organs were separated and weighted. Wet and dry (100°C for 48 h) weights of the viscera were recorded for each individual and visceral condition indices (VCI) were calculated as $VCI = \text{visceral dry weight} \times 100 / (\text{Shell length})^3$ [32].

A small fragment of the gonad was weighted, fixed in Bouin's solution for 48h and embedded in paraffin using standard methods. 5 μm histological sections were cut, mounted on glass slides and stained with the Masson's trichrome technique [33].

Each histological section of gonad tissue was examined under the microscope, and for each female, in at least 10 randomly selected fields the individual surfaces of about 150 randomly chosen mature oocytes (with clearly visible nucleoli to ensure that each section passed through the centre of the gamete) was measured by Image-Pro Express v6.0. Theoretical diameters were then calculated as: $D_{\text{theoretical}} = \text{Square root} (4 \times \text{surface} / \pi)$.

V. Statistical analyses

Statistical analysis was performed using an ANOVA, based on variance analysis. THC and agglutination titer values were log transformed and the percentage of haemocyte mortality values were (arcsin of the square root) transformed prior to statistical analysis. Note however that in the figures the original (non-transformed) data are presented.

Multivariate analyses were used to provide a reduced description of a large data set, to permit analysis of relationships between variables. Data were evaluated using Discriminant Analysis (DA) and Principal Component Analysis (PCA). These analyses were followed by linear correlations and ANOVA. These analyses were performed using the Statgraphics Plus 5.1 statistics software.

RESULTS

I. Spawning date and temperature

Spawning of abalone was estimated by comparing histological data of the gonads with the visceral condition index. The observed decrease of the mean diameter of mature ovocytes and of the visceral condition index between June 12th and July 12th (from 116 to 101 μm and from 7.6×10^{-6} to 5.6×10^{-6} , respectively) was indicative for a partial spawning event between these two dates (Figure 1A, 1B, Table 1). A second decrease of these parameters was observed when total spawning occurred between September 4th and September 26th. Mature ovocytes had disappeared at the end of September, and the visceral index had decreased from 6.3×10^{-6} to 5.4×10^{-6} (Figure 1A, 1B, Table 1).

During the survey period, the mean seawater temperature in the Bay of Brest was 16.4°C ($\pm 1.1^\circ\text{C}$, s.d.) with an extreme minimum of 13.7°C and a maximum of 18.1°C. The temperature never exceeded 18°C for more than one day, and the mean temperature during the complete spawning period (September 4th and September 26th) was 16.7°C. No mortalities were observed during this survey.

II. Susceptibility

Abalone susceptibility, indicated by the percentage of survival after immersion with *V.harveyi* Orm4 bacteria at 19°C, was evaluated in the laboratory from June to September. Survival decreased progressively from 90% in June to 10% in September (Figure 1C). Surprisingly, in both September samples, some control abalone placed at 19°C in 0.5 μm filtered seawater without bacteria also died (Figure 1C). The other control of abalone, placed at lower temperature, 17°C without bacteria, did not suffer any mortality. From the moribund 19°C control animals, a bacterial culture could be isolated from haemolymph and muscle which was directly pure. By PCR with *V. harveyi*-specific toxR primers

and after 16s sequencing, the isolated bacteria were shown to correspond to *V. harveyi*, suggesting that these abalone may have been disease-free carriers.

Table 1: Statistical analysis comparing physiological, haemocyte, enzymatic and haemolymph parameters to the rearing date (n=10, ANOVA) and comparing these parameters to the gonad maturation group (ANOVA). VCI: visceral condition indices, THC: Total haemocyte counts; ROS: reactive oxygen species; PROT: Total protein content; SOD: Superoxide dismutase; - : no significant differences, *: p<0.05; Letters indicate significant differences between dates.

	6/12	7/12	8/02	9/04	9/26	Date Effect	Gonadal Development States Effect
	Before spawning	Between partial and total spawning			After total spawning		
Physiological parameters							
Visceral index VCI (*10 ⁻⁶)	7.6 a	5.7 b	6.2 b	6.3 b	5.4 b	*	*
Mature oocyte diameter	116 a	101 b	104 c	115 ac	n.d.	*	*
Haemocyte parameters							
Size (U.A.)	192	196	185	194	190	-	-
Complexity (U.A.)	97 a	84 b	80 b	89 ab	81 b	*	*
THC (cell/ml * 10 ⁶)	3.2 ab	4.7 b	7.8 c	3.8 ab	1.9 a	*	*
Cell mortality (%)	2.4 a	2.5 a	1.5 b	2.1 ab	1.8 ab	*	-
Phagocytosis Index (%)	32 a	32 a	22 b	12 b	17 b	*	*
Basal ROS Production (U.A)	126 a	180 b	144 c	191 b	179 b	*	*
Enzymatic measurement							
DOPA-oxydase (U. mg protein ⁻¹)	3.4 a	2.7 b	3.1 ab	2.5 b	1.5 c	*	*
LAP (*10 ⁻⁴ dOD. min ⁻¹ .mg protein ⁻¹)	5.6	6.9	8.7	12.7	7.5	-	-
SOD (Ueq. mg protein ⁻¹)	0.9	1.8	2.1	1.5	2.9	-	-
Haemolymph parameters							
Total protein content (mg.ml ⁻¹)	9.4 a	8.9 b	8.8 b	8.3 b	8.3 b	*	-
Agglutination titer (log)	4.9 a	4.9 a	5.6 ab	6.0 b	5.8 b	*	*

III. Immunity

A. Season effect on haemolymph immune parameters

In August, total haemocyte counts peaked (7.8×10^6 cell. mL⁻¹, $p < 0.01$, [Figure 2A](#), [Table 1](#)) and at the same time, the very low (< 3%) haemocyte mortality decreased and reached a minimum (1.5%, $p <$

0.05, [Figure 2A](#), [Table 1](#)). A decrease of cells size (not significant) and complexity was also observed in August and at the end of September ([Table 1](#)).

Phagocytosis, represented by the phagocytosis index, showed also a significant decrease from July to September ([Figure 2B](#), [Table 1](#), $p < 0.001$). Basal ROS production presented two peaks in July and September (180 and 191 UA, respectively, [Figure 2B](#), [Table 1](#), $p < 0.001$).

Significant differences in mean phenoloxidase activity (PO, $p < 0.001$, [Figure 2B](#), [Table 1](#)), agglutination titer ($p < 0.05$, [Figure 2C](#), [Table 1](#)) and total protein content ($p < 0.05$, [Figure 2C](#), [Table 1](#)) were also observed according to the season. No differences were found in LAP and SOD activity throughout the survey ([Table 1](#)).

It is noticeable that cell complexity and PO activity significantly decreased with both spawning events, whereas total protein content and phagocytosis significantly decreased between spawning events, i.e. simultaneously with the gonadal maturation process ([Table 1](#))

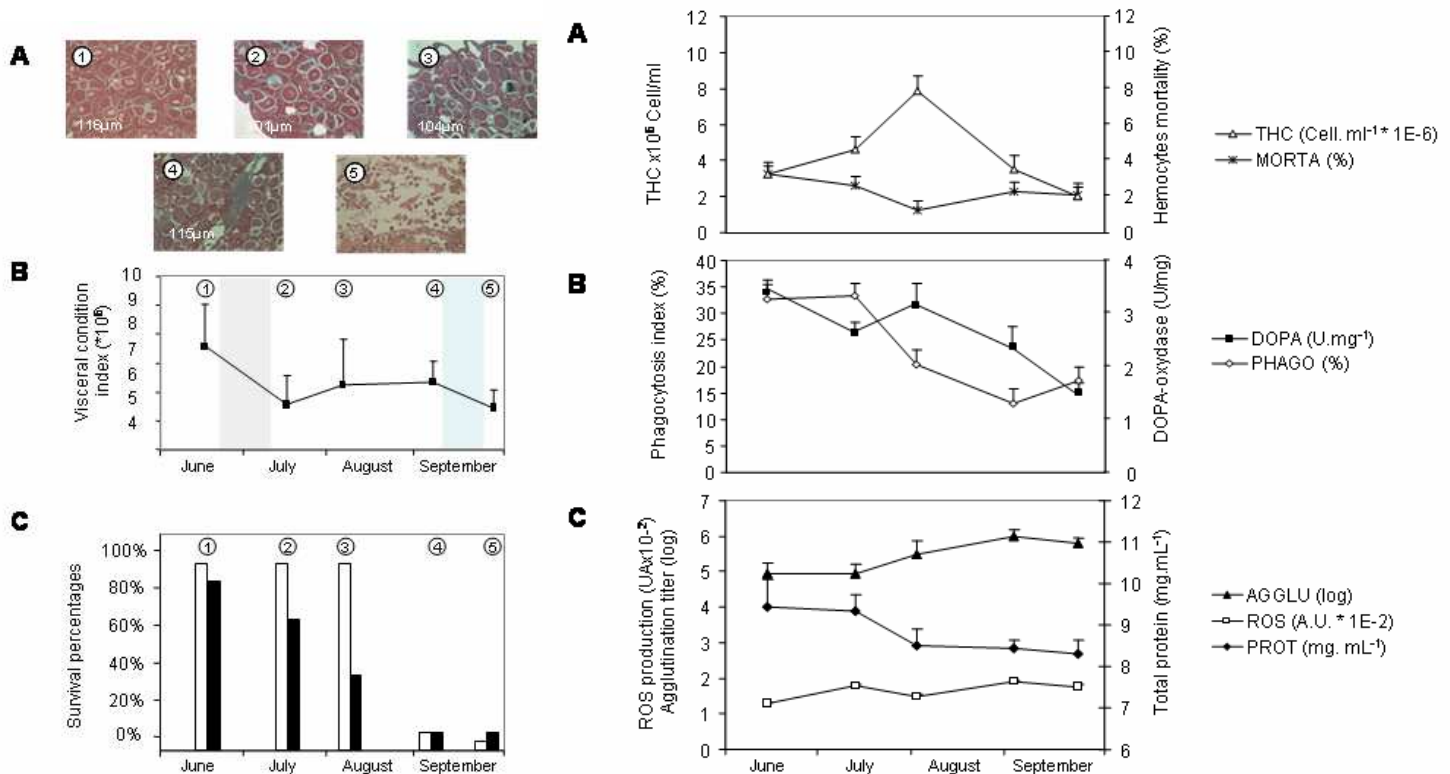


Figure 1: Field survey. **A.** Oocytary diameter seasonal follow-up. The mean diameter of mature ovocytes is indicated at the left corner of the pictures. Numbers correspond to the sampling dates: ① June 12th, ② July 12th, ③ August 2nd, ④ September 4th, ⑤ September 26th. **B.** Visceral condition index and the estimation of spawning dates: partial spawning (dark grey area) and total spawning (light grey area). **C.** Survival of abalone at 19°C after 10 days with (black bars) or without *V. harveyi* (white bars).

Figure 2: Immune parameters followed during the seasons. **A.** Total haemocyte counts (THC, cell. mL⁻¹) and haemocyte mortality rates (%). **B.** Phagocytosis index (%) and PO activity (U. mg protein⁻¹). **C.** Basal oxidative production (ROS, A.U. Arbitrary Units), agglutination titer (log) and total protein content (PROT, mg. mL⁻¹).

B. Differences between season and gonad classes

Discriminant analysis was performed on all immune data to validate sampling groups (i.e. the physiologically significant groups), as statistically significant groups. Therefore five groups (each sampling) were postulated. Classification functions permitted to correctly class 93% of individuals for

sampling groups (Wilks's lambda = 0.003 and p -value < 0.001) and could thus be used for further statistical analyses (Figure 3).

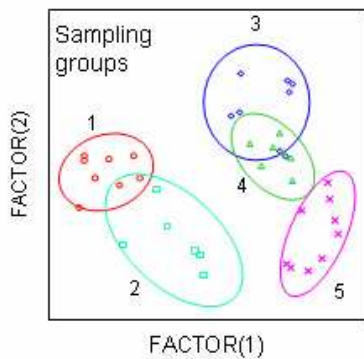


Figure 3: Discriminant Analysis (DA) of immune parameters classed by dates. Sampling (1) corresponds to June 12th, (2) to July 12th, (3) to August 2nd, (4) and (5) to September 4th and 26th.

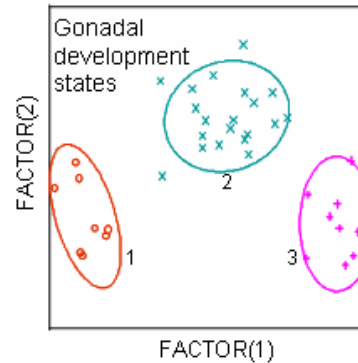


Figure 4: Discriminant Analysis (DA) of immune parameters classed by histological gonad maturation groups. Group (1) 'Before spawning' corresponds to June 12th, group (2) 'Between partial and total spawning' to July 12th, August 2nd, and September 4th and groups (3) 'After total spawning' to September 26th.

Similarly, with all immune data, discriminant analysis was performed to validate gonadal development states (i.e. the biologically significant groups based on histology), as statistically significant groups. Therefore three groups were postulated: before spawning (June 12th), between partial and total spawning (July 12th, August 2nd, September 4th) and after total spawning (September 26th), leading to functions were 100% of individuals for gonad maturation groups were correctly classed (Wilks's lambda = 0.002 and p -value < 0.001) (Figure 4).

We also tested the variation of immune parameters by these three histologically significant groups: similar tendency was found, as all parameters (except total protein content and cell mortality) significantly influenced by dates were also significantly influenced by gonadal development states. Concordance between immune parameter variations and reproduction events was thus observed.

C. Season effect on global haemolymph profile

In the Principal Component Analysis performed on all measured immune parameters measured (Figure 5), principal components PC1 and PC2 explained more than 53% of the total variance. The PC1 explained 34% of the total variance and was characterized by high loadings of several variables (haemocyte complexity, size, PO activity and phagocytosis index). These highly differentiating variables are directly associated with low basal ROS production and agglutination titer (or vice versa).

The first component of this PCA, corresponding to the so-called "haemolymph profile" (HP), was extracted. The effect of season on the HP was significant as it significantly decreased both in July and at the end of September, i.e. during both spawning

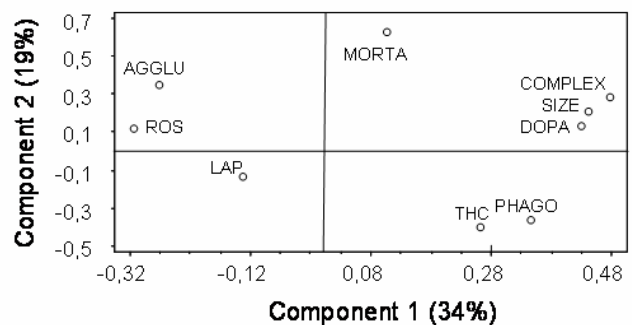


Figure 5: Principal Component Analysis (PCA) plot of selected immune parameters. MORTA: haemocyte mortality; AGGLU: agglutination titer; ROS: Reactive oxygen species production; LAP: leucine amino peptidase activity; COMPLEX: haemocyte mean complexity; SIZE: haemocyte mean size; PO: phenoloxidase activity; THC: total haemocyte count; PHAGO: phagocytosis index.

events ($p < 0.05$, [Figure 6A](#)). Similarly, between July and August, i.e. during gonadal maturation, a significant decrease of HP was observed ([Figure 6A](#)).

D. Immunity and susceptibility

A statistically significant regression explaining 62% of susceptibility variance was observed between the HP and animal susceptibility (survival rate after infection at 19°C, $p < 0.001$, [Figure 6B](#)). When the HP was high (high haemocyte complexity, size, DOPA oxidase activity and phagocytosis index, associated with low basal ROS production and agglutination titer), abalone survival rates were also high.

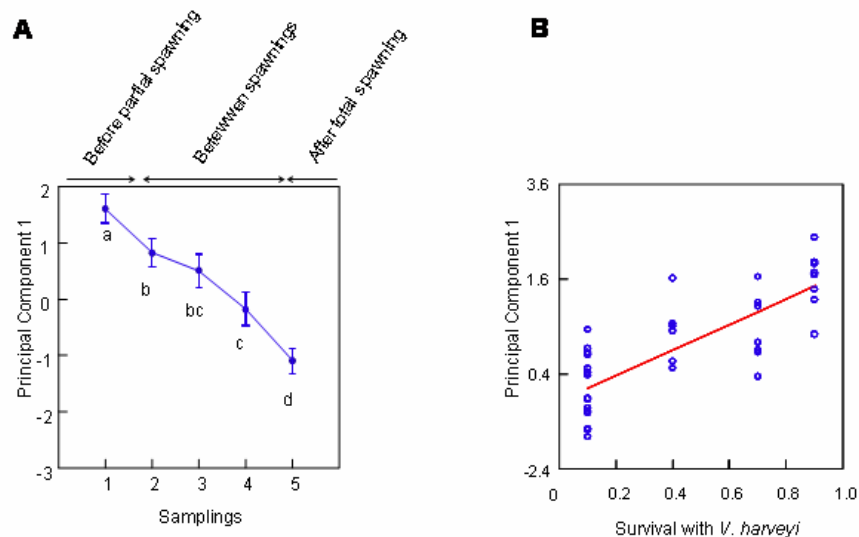


Figure 6: Component 1 from Principal Component Analysis of selected immune parameter (A) within samplings or (B) in correlation with survival rates in presence of *V. harveyi*. $y = 2.8226x - 0.9742$; $r^2 = 0.6249$.

DISCUSSION

The objective of this study was to compare abalone immune status in correlation with gonadal development state, and to study the relationship between reproduction and susceptibility to *V. harveyi*.

Increased susceptibility to bacterial contamination after spawning

As suggested by previous work [1] there is a clear relationship between spawning period and abalone disease susceptibility. Such a relationship has also been shown in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, as spawning effort has been correlated to increased mortalities [34]: both triploid oysters, considered as sterile [5], and oysters in low trophic condition “summer mortalities” than ripe diploid oysters [34].

Abalone susceptibility to *V. harveyi*, estimated by bacterial immersion challenges at 19°C, was maximum in September coinciding with the period of total spawning. Bacterial susceptibility increased from 10% mortality during the partial spawning period to reach 90% mortality just after the major spawning event. Myrand et al. reported in mussels also the importance of a second, and major mussel spawning on the appearance of summer mortalities [35].

In September, abalone were found to be free carriers of *V. harveyi*, which was revealed when 90%, apparently healthy, animals died when placed in laboratory conditions adequate for disease development, i.e. at a temperature of 19°C. Similar observations were done after susceptibility experiments performed in September on field abalone in Normandy (Basuyaux, personal communication). It is important to note that in this study, the control abalone placed at 17°C did not develop any mortalities although they came from the same field-positions as the 19°C animals. This result underlines the major role of temperature as a trigger for vibriosis development in *H. tuberculata*.

Temperature during spawning is one of the keys for the *V. harveyi* infection to succeed, as it requires at least 18°C to obtain disease in experimental infections [36]. Seawater temperature measured in the Bay of Brest during the summer of 2007 never exceeded 18°C for more than a day, and only reached a mean of 16.7°C during the major spawning period. *V.harveyi* is known to have a high optimal growth temperature of about 30°C, and its growth capacities around 16°C are rather limited (Travers, unpublished results). Disease development in Brittany waters is probably depending on very little temperature differences. The temperatures of less than 18°C in the Bay of Brest could therefore explain the absence of natural mortalities, as well as the free carrier status of abalone, and disease development at 19°C in the laboratory. To clarify these issues, free-carrier localization and penetration processes by *V. harveyi* should be studied in detail.

Relationship between reproduction and immune depression

Many studies reported the effect of specific pathogens on mollusc immunity. These are often pathogen-specific, and show only how a pathogen undermines the animal's immune system [37]. The results cannot be generalized to other models or conditions. The approach here is more general and asks whether seasons or maturation can affect immunity, and eventually lead to an increased susceptibility to pathogens.

Many immune parameters measured in this study showed clear seasonal variation. THC, cell complexity, haemocyte mortality, phagocytosis capacity, basal ROS production, phenoloxidase activity and agglutination titers significantly changed over time. After a partial spawning in August, an increase in THC, associated with a decrease in cell size and cell complexity, could indicate haemocyte "production", as it was previously suggested in bivalves [38, 39].

Two spawning events were recorded for abalone in the Bay of Brest in 2007, in June-July and in September. Phagocytosis and PO activity, which are two main haemocyte immune capacities, were significantly decreased during the maturation process or spawning events, respectively. "Haemolymph profile" (HP) extracted from the PCA analysis varied also in concordance with the maturation and spawning processes, as HP decreased after spawning events and during gonadal maturation (i.e. less cells, smaller and less complex, low phagocytosis and PO activity, associated with high basal ROS production and agglutination). Reduced phagocytosis activity was previously reported during the reproductive effort for clams [40], oysters [4] and blue mussel [41]. PO and phagocytosis activity were also found down-regulated in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the post-moult season [42]. Some authors suggested a potential control of the immune system by steroid hormones that could explain the phagocytosis suppression during the reproductive effort [41].

However, it should be noted that many other factors can also cause seasonal fluctuations in oysters, clams and mussels, such as PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), PCBs (Polychlorinated Biphenyls), metals, TBT (Tributyltin)[43-45], toxic algae [46, 47], high or low temperatures [19, 28, 48, 49], salinity [50], dissolved oxygen [51] or "stress" [21, 52]. Therefore, due to our approach with a random sample of a field population, we cannot exclude that some variation (particularly haemocyte concentrations) in our data may be attributed to other a-biotic factors. Besides this reservation, our data clearly show a sound concordance between the evolution of immune parameters or HP and the maturation status of the animals.

Immunity suppression: link with abalone susceptibility to infection by *V. harveyi*

Two main periods of immune-depression are in general reported: winter, principally because of low food availability leading to a decrease in condition index [53, 54]; and late summer, because of the spawning effort [55]. These periods are generally associated with either cold- or warm-water diseases, as they also correspond to parasite or bacteria proliferation.

For example, reduced phenoloxidase activity in some populations was shown to facilitate lethal infections in Sydney rock oyster by *Marteilia sydneyi* [56], and immune-depression caused by stress was shown to increase bacterial susceptibility *in vitro* and *in vivo* in oysters [57, 58] or abalone [52]. But all these studies did not provide a link of the changes in immune status with the animals' natural physiology state.

The only example to our knowledge where a more global and follow-up approach was used, is the MOREST program on the Pacific oyster, *C. gigas*. They show that well-fed normal oyster, diploid oysters, or families selected as more susceptible to “summer mortality” were all highly vulnerable to pathogens, and presented an immune-depressed phenotype. This, in comparison with food-limited normal oysters, triploid oysters, or genetically selected “summer mortality-resistant” oysters. The susceptibility for “summer mortalities” was partly explained with the depressed immune-phenotype and the highly active spawning processes in the first group of animals [59, 60].

Similarly, in the present work, a clear positive correlation between a natural abalone immune status in a specific season and survival after bacterial challenge was found. This suggests that immune depression associated with the spawning period (low phagocytosis, low phenoloxidase activity, low THC with small and poorly complex cells, and high basal ROS production) increases abalone susceptibility to *V. harveyi*.

In conclusion, a concordance between maturation and spawning processes, immune status and abalone susceptibility to *V. harveyi* was demonstrated. However, since, as well the gonadal development, as the pathogen’s proliferation are shown to be directly influenced by temperature, their respective contribution in disease development should be dissected to understand their relative importance.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Robert Marc, Jonathan Fly-Sainte Marie, Frédéric Jean, Joëlle Richard, Laurent Chauvaud and Erwan Amice for all the scuba dive sampling. We thank Dr Hélène Hégaret for her careful revision of the manuscript, and Drs. Philippe Soudant and Christophe Lambert for stimulating discussions and suggestions. This study was supported by ‘France Haliotis’ SCEA, and the “Région Bretagne”. This is contribution n°XXX of the European Institute for Marine Studies (Brest, France)

REFERENCES

- [1] Huchette SMH, Clavier J. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *J. Shell. Res.* 2004;23(4):951-55.
- [2] Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurie J, Thebault A. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis Aquat Org.* 2002;50(1):35-43.
- [3] Austin B, Zhang XH. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(2):119-24.
- [4] Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Moal J, Pouvreau S, Samain JF. Impact of food availability on energy storage and defense related to hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture.* 2006;254:571-82.
- [5] Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, Geairon P, Le Moine O, Renault T. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture.* 2006;54:606-16.
- [6] Duchemin MB, Fournier M, Auffret M. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture.* 2007;264(1-4):73-81.
- [7] Chu F-LE. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerma M, Nagabhushanam R, eds. *Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and pathology*. Enfield (NH), USA; Plymouth, UK: Sciences publishers 2000:1-42.
- [8] Cho S-M, Jeong W-G. Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture.* 2005;244(1-4):383-7.
- [9] Pipe RK. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical journal.* 1990;22:595-603.
- [10] Lambert C, Soudant P, Choquet G, Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 2003;15(3):225-40.
- [11] Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 2000 Dec 15;486(3):185-90.
- [12] Hine PM. The inter-relationships of bivalves hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 1999;9:367-85.
- [13] Bachère E, Mialhe E, Noël D, Boulo V, Morvan A, Rodriguez J. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture.* 1995;132:17-32.

- [14] Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev.* 2004;198:149-68.
- [15] Travers MA, Da Silva PM, Le Goïc N, Marie D, Donval A, Huchette SMH, et al. Morphologic, cytometric and functional characterization of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2008;24(4):400-11.
- [16] Chen H, Mai K, Zhang W, Liufu Z, Xu W, Tan B. Effects of dietary pyridoxine on immune responses in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish Shellfish Immunol.* 2005;19(3):241-52.
- [17] Cheng W, Hsiao IS, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2004;17(3):193-202.
- [18] Cheng W, Hsiao IS, Chen JC. Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Dis Aquat Org.* 2004;60(2):157-64.
- [19] Cheng W, Hsiao IS, Hsu CH, Chen JC. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2004;17(3):235-43.
- [20] Martello LB, Tjeerdema RS. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone. *Aquat Tox.* 2001;51(3):351-62.
- [21] Hooper C, Day R, Slocombe R, Handlinger J, Benkendorff K. Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.* 2007;22(4):363-79.
- [22] Harris L, Owens L, Smith S. A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(9):3548-50.
- [23] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- [24] Kalmbach S, Manz W, Szewzyk U. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(11):4164-70.
- [25] Conejero MJ, Hedreyda CT. Isolation of partial toxR gene of *Vibrio harveyi* and design of toxR-targeted PCR primers for species detection. *J Appl Microbiol.* 2003;95(3):602-11.
- [26] Auffret M, Oubella R. Cytology and cytometric analysis of bivalve mollusc haemocytes. In: Stolen JS, Fletcher TC, eds. *Techniques in Fish Immunology Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates*. Fair Haven, New Jersey: SOS Publications 1995:55-64.
- [27] Allam B, Ashton-Alcox A, Ford SE. Flow cytometric measurement of haemocyte viability and phagocytic activity in the clam, *Ruditapes philippinarum*. *J Shell Res* 2002;21:13-9.
- [28] Hégaret H, Wikfors HG, Soudant P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation; II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2003;293:249-65.
- [29] Ford SE, Paillard C. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 2006 Nov 6.
- [30] Ahmed H, Schott EJ, Gauthier JD, Vasta GR. Superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. *Anal Biochem.* 2003; 318 132–41.
- [31] Barracco MA, I.D M, Moreira FM. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellfish Immunol.* 1999;9:387-404.
- [32] Basuyaux O. Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques sur la croissance de l'ormeau *Haliotis tuberculata* en circuit semi-fermé.: Université de Caen; 1997.
- [33] Bancroft A, Stevens JD. *Theory and practice of histological techniques*. New-York: Churchill Livingstone 1982.
- [34] Samain JF, McCombie H. Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : Défi Morest 2007. Eds Ifremer/Quae.
- [35] Myrand B, Guderley H, Himmelman JH. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Mar Ecol Prog Ser.* 2000;197:193-207.
- [36] Travers MA, Basuyaux O, Nicolas JL, Friedman CS, Huchette S, Koken M, et al. Temperature dependent vibriosis of the European abalone *Haliotis tuberculata*. National Shellfisheries Association; 2008; Providence, USA.
- [37] Adamo SA. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour.* 2004;68:1443–9.

- [38] Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A, et al. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis (=Tapes, =Ruditapes) philippinarum*. *Aquaculture*. 2004;229:401-18.
- [39] Fisher WS, Oliver J, Edwards P. Hematologic and serologic variability of Eastern oyster from Apalachicola Bay, Florida. *J Shell Res* 1996;15:555-64.
- [40] Matozzo V, Da Ros L, Ballarin L, Meneghetti F, Marin MG. Functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the lagoon of Venice: fishing impact and seasonal variations. *Can J Fish Aquat Sci*. 2003;60:949-58.
- [41] Cartier S, Pellerin J, Fournier M, Tamigneaux E, Girault L, Lemaire N. Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquaculture*. 2004;241:633-54.
- [42] Liu CH, Yeh ST, Cheng SY, Chen JC. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. *Fish Shellfish Immunol*. 2004;16(2):151-61.
- [43] Oliver LM, Fisher WS, Volety AK, Malaeb Z. Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquat Toxicol*. 2003;64(4):363-73.
- [44] Pipe RK, Coles JA. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shell Immunol*. 1995;5(8):581-95.
- [45] Oliver LM, Fisher WS, Winstead JT, Hemmer BL, Long ER. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquat Toxicol*. 2001;55(3-4):203-22.
- [46] Galimany E, Sunila I, Hégaret H, Ramón M, Wikfors GH. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae*. In press.
- [47] Hégaret H, da Silva PM, Wikfors GH, Lambert C, De Bettignies T, Shumway SE, et al. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat Toxicol*. 2007;84(4):469-79.
- [48] Tiscar PG, Mosca F. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet res comm*. 2004;28 Suppl 1:57-62.
- [49] Paillard C, Allam B, Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org*. 2004;59(3):249-62.
- [50] Cheng W, Juang FM, Chen JC. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish Shellfish Immunol*. 2004;16(3):295-306.
- [51] Cheng W, Liu CH, Cheng S-Y, Chen J-C. Effect of dissolved oxygen on the acid-base balance and ion concentration of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Aquaculture*. 2004;231:573-86.
- [52] Malham S, Lacoste A, Gelebart F, Cueff A, Poulet S. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2003;295(2):136-44.
- [53] Oubella R, Maes P, Paillard C, Auffret M. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Org*. 1993;15:193-7.
- [54] Paillard C, Maes P, Oubella R. Brown Ring Disease in Clams. *An Rev Fish Dis*. 1994;4:219-40.
- [55] Samain JF, Dégremont L, Soletchnik P, Haure J, Bédier E, Ropert M, et al. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 2007;268:227-43.
- [56] Peters R, Raftospeters DA. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture*. 2003;223:29-39.
- [57] Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cueff A, Poulet SA. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(5):2304-9.
- [58] Lacoste A, Malham SK, Gelebart F, Cueff A, Poulet SA. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*. 2002;26(1):1-9.
- [59] Lambert C, Soudant P, Dégremont L, Delaporte M, Moal J, Boudry P, et al. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture*. 2007;270:276-88.
- [60] Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Jegaden M, Moal J, Pouvreau S, et al. Characterization of physiological and immunological differences between Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J Exp Mar Biol and Ecol*. 2007;353:45-57.

CHAPITRE 3 : Souches de *V. harveyi* et virulence

V. harveyi est une bactérie qui affecte un large spectre d'animaux marins, et que l'on peut retrouver dans la plupart des océans. Des épisodes de mortalités d'ormeau liés à *V. harveyi* ont touché le littoral français depuis 1998. L'agent responsable de ces mortalités, *V. harveyi*, a été isolé en Normandie 1999 et 2000 (Ifremer, Nicolas *et al.* 2002). D'autres souches de *V. harveyi* ont pu être isolées en 2004, 2005 (Ifremer) et en 2007 (Article 1). Leur identification a été faite sur la base des séquences de l'ADNr 16s, et du gène *toxR*. L'utilisation des amorces spécifiques (permettant l'amplification du gène *toxR*) décrites par Conejero (2002) a également été validée sur une trentaine de souches de *Vibrio*, et nous permet l'identification rapide des souches isolées.

A partir de ces différentes souches de *V. harveyi* isolées d'épisodes de mortalités d'ormeaux et des souches de collection du laboratoire, l'étude de leur virulence, estimée par des expériences de balnéation d'ormeaux, nous a amené à considérer deux groupes d'isolats de *V. harveyi* : les virulents (entraînant en moyenne 80% de mortalité, représentés par la souche ORM4) et les non virulents (0% de mortalité, représentés par la souche LMG 7890) (Article 5 et 6).

De part l'importance de la température sur le développement de la maladie, nous nous sommes tout d'abord intéressé à la croissance des différentes souches à différentes températures. Il est apparu que toutes les souches de *V. harveyi* testées (présentées dans le tableau 1 de l'article 6) ont un optimum de température proche de 32°C (temps de génération de 1 heure environ), mais que celles-ci sont capables de pousser en milieu riche à des températures de 16, 17 ou 18°C, indifféremment (Figure 34). Ainsi, l'effet de la température sur la croissance bactérienne, ne semble par suffire à expliquer le seuil de température déterminant l'apparition des mortalités, et la différence de virulence des isolats de *V. harveyi*.

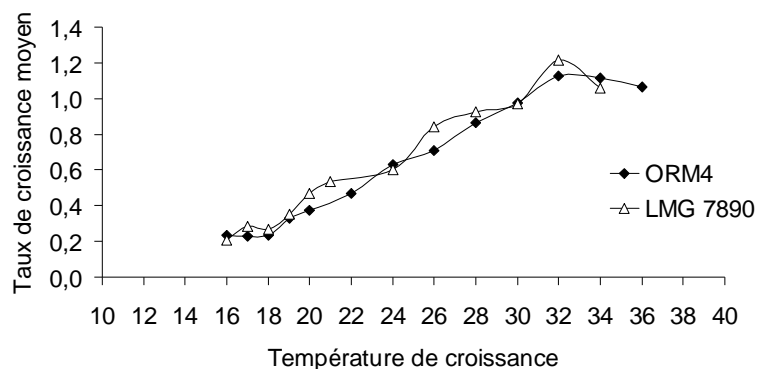


Figure 34: Estimation du taux de croissance moyen pendant la phase exponentielle de croissance de différentes souches de *V. harveyi*.

Ces expériences ont été réalisées au moins 3 fois (à partir du même stock glycérolé conservé à -80°C), par suivi des densités optiques (Bioscreen C, Norden Lab). Les taux de croissance (h⁻¹) obtenus à différentes températures pour les souches ORM4 et LMG 7890 sont ici présentés.

La vibriose de l'ormeau se concluant par une septicémie fatale à l'animal, l'interaction hémocyte – bactérie semble être une des étapes décisives du processus infectieux. Les bases moléculaires de l'infection permettant d'expliquer comment la bactérie arrive à se multiplier au sein de l'hémolymphe des ormeaux, au contact des cellules immunitaires, sont inconnues, et demandent donc à être étudiées.

La réponse moléculaire de hémocytes suite au contact avec des souches de *V. harveyi* pathogènes (ORM4) et non pathogènes (LMG 7890) a été étudiée à travers l'activation de la voie de la MAP Kinase p38, un des acteurs impliqué dans la mise en place de la réponse immunitaire suite à une infection bactérienne. Le but de notre travail a été de comprendre l'implication de la voie p38-MAP Kinase dans la transduction du signal en réponse à *V. harveyi*.

L'importance de cette voie de transduction dans l'élimination des souches de *V. harveyi* non pathogènes pour l'ormeau – par la production hémocytaire d'espèces oxygénées réactives, consécutive à la phagocytose – a été démontrée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la MAP Kinase p38, le SB203580. De plus, la souche virulente de *V. harveyi* s'est montrée capable d'inhiber la réponse hémocytaire (dégradation des bactéries et

production d'EOR), et de croître en présence d'hémocytes. La signalisation hémocytaire face à cette souche est apparue « naturellement » affectée par ce pathogène (phosphorylation de la MAP Kinase p38 plus tardive, moins forte et plus courte que celle induite par les souches non pathogènes). Ces résultats suggèrent une potentielle modulation de cette voie de transduction comme stratégie d'échappement de cette bactérie ([Article 5](#)).

Enfin, le support génétique de la virulence de certaines souches de *V. harveyi* a été recherché, et une comparaison génétique des souches a permis de démontrer la présence d'un nouveau plasmide, nommé pVCR1, dans la souche ORM4, pathogène de référence pour l'ormeau européen. Ce plasmide de 18 kb a été retrouvé dans toutes les souches pathogènes isolées lors de mortalités d'ormeaux à travers la France depuis 1999 (profil de restriction similaire), et non dans les souches de *V. harveyi* non virulentes pour l'ormeau. De plus, son transfert par électroporation, sans pression de sélection, dans des souches non pathogènes de *V. harveyi* a permis de prouver sa conservation naturelle, et son implication dans la virulence des souches ([Article 6](#)). Son séquençage est actuellement en cours, et un test de détection par PCR, spécifique des souches de *V. harveyi* pathogènes pour l'ormeau, a été développé.

Article 5: Travers, M.A., Le Bouffant, R., Friedman, C. S., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., Koken, M. and Paillard, C. (Soumis à Journal of Cellular Biochemistry). Abalone haemocytes response with virulent and avirulent strains of *V. harveyi*: p38 MAPK involvement.

Article 6: Travers, M.A., Barbou, A., Huchette, S., Paillard, C. and Koken, M. (En préparation). pVCR1, a plasmid responsible for the virulence of *Vibrio harveyi* strain ORM4 towards the European abalone, *Haliotis tuberculata*

Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic isolates, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response

Article 5: Soumis à Journal of Cellular Biochemistry

Marie-Agnès Travers^{1,2}, Ronan Le Bouffant³, Carolyn S. Friedman⁴, Florence Buzin², Bertrand Cougard², Sylvain Huchette¹, Marcel Koken^{2γ} and Christine Paillard^{2γ*}

1 France Haliotis, Kerazan, Lilia, 29880 Plouguerneau, France

2 Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin, CNRS UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

3 Université Paris 7-Denis Diderot / INSERM U566 / CEA, Laboratoire de différenciation et de radiobiologie des gonades, Unité gamétogenèse et génotoxicité, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

4 School of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington, Seattle, Washington 98195 USA

ABSTRACT

Vibrio harveyi is the marine pathogen responsible for abalone epidemics associated with massive mortalities. The aim of this study was to understand the possible role of the p38-MAPK signal transduction pathway in abalone haemocyte responses to *V. harveyi*. Pathogenicity of several *V. harveyi* strains were compared via both immersion and injection trials: The concentration of non-pathogenic bacterial strains to kill abalone was higher than that of pathogenic strains. LD₅₀ values of non-pathogenic *V. harveyi* ranged from 8.9×10^4 to 1.6×10^5 CFU. animal⁻¹, while those of the pathogenic ORM4 strain was only 2.5×10^2 CFU. animal⁻¹. The importance of the p38-MAPK pathway in the elimination of non-virulent *V. harveyi* strains - through haemocyte phagocytosis and ROS production - was demonstrated by using of a specific p38 inhibitor, SB203580. However, virulent *V. harveyi* strains were shown to escape from haemocyte attack by avoiding in part the exploitation of the p38 signalling pathway. Taken together, our results suggest that p38-MAPK modulation may be one of the ways of virulent *V. harveyi* to attack its host and escape abalone immune response.

* Corresponding author. E-Mail: christine.paillard@univ-brest.fr
Tel: +332 98 49 86 50
Fax: +332 98 49 86 45

^γM.K. and C.P. should be considered as last co-authors

Running head: p38-MAPK and *V. harveyi* immune evasion

keywords: *Vibrio harveyi*, *Haliotis tuberculata*, virulence, haemocytes, p38-MAPK

Figure and tables: 7

INTRODUCTION

Vibrio harveyi is a marine pathogen that affects a large range of animals [Austin and Zhang, 2006] which was recently shown to be responsible for abalone epizooties occurring in France since 1998, both in farm and in wild stocks of *Haliotis tuberculata* [Gauger and Gomez-Chiarri, 2002; Nicolas et al., 2002]. This Gram-negative bacterium was also found associated with abalone disease in Australia and Japan [Handlinger et al., 2005; Sawabe et al., 2007]. The disease starts with loss of muscular strength, appearance of white pustules on the foot, and finally abalone death. In a few days, *V. harveyi* infection can lead to a fatal septicaemia, associated with up to 80% of mortalities within a few days to 3 weeks [Handlinger et al., 2005; Nicolas et al., 2002].

Abalone immunity is principally based on their circulating cells, the haemocytes [Cheng, 1981; Travers et al., 2008] and the effectors they excrete. Although mollusc haemocytes play a role in various functions as nutrient digestion, metabolite transport, and wound and shell repair [Sparks and Morado, 1988], their main role is in internal defence. They are responsible for chemotaxis, lectin-mediated pathogen recognition, phagocytosis, encapsulation and elimination of invaders via enzymatic destruction and/or by the production of antimicrobial peptides [Bachère et al., 2004; Cheng, 1981; Hooper et al., 2007; Mitta et al., 2000]. For cellular immune response to be effective, haemocytes must migrate, attach to the invader, endocytose, phagocytose, and finally kill the invaders, classically done by secretion of the highly toxic reactive oxygen species (ROS).

The first step of the immune response is pathogens recognition, which, in turn, leads to signal transduction and the appropriated cellular response. The MAP Kinase (MAPK) signal transduction pathway is constituted of a family of serine/threonine kinases implicated in many cellular processes, including stress, cell cycle and growth control but also host defence [For reviews Cowan and Storey, 2003; Seger and Krebs, 1995]. Actually, the three most characterized MAPKs families are the ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinase 1 and 2, or p42/p44), the JNK46/54 (c-jun N-terminal kinases 46 and 54) and the p38 kinases.

These kinases are well conserved during eukaryotic evolution and orthologous genes were recently isolated and characterized in both marine and freshwater gastropods, *Littorina littorea* [Iakovleva et al., 2006b] and *Biomphalaria glabrata* [Humphries and Yoshino, 2003; Humphries and Yoshino, 2006], respectively, the intermediate host involved in human Schistosomiasis or Bilharziosis. In response to contact with Gram-negative bacteria or in the presence of bacterial lipopolysaccharide, the phosphorylation of p38-MAPK is induced in molluscan haemocytes [Canesi et al., 2002a; Canesi et al., 2002c; Iakovleva et al., 2006a], leading to efficient bacterial phagocytosis. The addition of p38-MAPK inhibitors reduces these phagocytosis responses, and thus pathogen degradation [Canesi et al., 2002c; Iakovleva et al., 2006a].

The use of different MAPK cascade inhibitors has allowed the demonstration that the ERK signalling pathway is specifically involved in phagocytosis, encapsulation and ROS production upon infection of *B. glabrata* haemocytes with the flatworm, *Schistosoma mansoni* [Zelck et al., 2007]. By using a p38-MAPK inhibitor, SB203580 the same authors also demonstrate the involvement of p38 in phagocytosis. It was suggested that the MAPK-induced oxidative burst [Zelck et al., 2007] was mediated by NADPH oxidase recruitment [Humphries and Yoshino, 2003].

Pathogens can act in different manners to undermine the protective abilities of molluscan haemocytes. *Vibrio tapetis*, for instance, is a pathogen of the manila clam, *Tapes philippinarum*, and is known to intervene with the haemocyte's cytoskeleton and to reduce their adhesion properties both for the pathogen and the substratum [Choquet et al., 2003]. Other pathogens have been shown to reduce haemocyte viability or their phagocytosis capacity [Labreuche et al., 2006]. Abalone infected with *V. harveyi* show little to no visible host response based on microscopic examination of stained tissue sections [Nicolas et al., 2002; Travers, unpublished]. The strategy employed by pathogenic *V. harveyi* strains to overcome the abalone immune response is thus far unknown.

Our study aimed at understanding the role of the p38 MAPK signal transduction pathways in the haemocyte response to *V. harveyi* infection. By incubating haemocytes with virulent or non-virulent *V. harveyi* strains, combined or not with a specific p38-MAPK inhibitor, SB203580, we could demonstrate the importance of the p38-MAPK pathway in the elimination of non-virulent *V. harveyi*. However, virulent *V. harveyi* is apparently able to avoid the “normal” haemocyte phagocytosis and ROS production processes, leaving the question unanswered how this pathogen escapes its host’s defences.

MATERIAL AND METHODES

Chemicals – The phospho-Thr180/Tyr182 specific p38 MAPK (clone #9211) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. The inhibitor, SB203580, and rabbit polyclonal antibodies against actin (clone 20-33) were purchased from Sigma and peroxidase-conjugated secondary antibodies from Biorad.

Bacterial strains – The following several strains of *Vibrio harveyi* strains were employed (Table 1): the virulent strains, ORM4, isolated from moribund abalone in 1998 [Nicolas et al., 2002] and strains 53 and 92, isolated from moribund abalone in 2004 and 2005, respectively; and the non-virulent collection strains, LMG 7890 and LMG 4044, obtained from the “Laboratorium voor Microbiologie” (Universiteit Gent, Belgium). CECT4600T is the *Vibrio tapetis* type strain and was originally isolated from manila clams by the authors [Borrego et al., 1996; Paillard and Maes, 1990]. *V. harveyi* and *V. tapetis* were cultured on Luria Bertani broth with additional salt (LBS, 20 g/l NaCl f.c.) at 28°C and 18°C, respectively. Before immersion or injection challenges, or for *in vitro* contacts, strains were grown overnight and washed twice in 0.2 µm filtered and sterilized seawater (FSSW). Bacterial concentrations were determined by optical density measure at 490nm.

Table 1: Origin location and references studies of *V. harveyi* strains used in this study.

Name	Origin location	Reference
ORM4	Isolated from moribund abalone, France 1998	Nicolas, 2002
LMG 7890	Isolated from brown shark (<i>Carcharhinus plumbeus</i>), kidney, Baltimore, USA,	R. Colwell 1982
LMG 4044T	Isolated from dead amphipod (<i>Talorchestia</i> sp.) Woods Hole Massachusetts USA,	F. Johnson 1965
Strain 92	Isolated from moribund abalone, France 2004	This study
Strain 53	Isolated from moribund abalone, France 2005	This study

Animals – Both wild and farmed abalone *Haliotis tuberculata*, and wild clams, *Ruditapes philippinarum*, were used in the studies. Adult wild abalone (60 – 80 mm shell length) were collected from natural populations in the Bay of Roscoff, Brittany (3°58’W, 48°43’N) in September 2005, and in the Bay of Brest, Brittany (4°33’W, 48°21’N) in July 2007. Animals were acclimatized in the laboratory for at least two weeks prior to the experiments in 110 L tanks with an open seawater circuit under continuous aeration. During the acclimation period, animals were fed ad libitum on a marine macroalgal diet of *Laminaria digitata* and *Palmaria palmata*.

Reproductively mature (ripe) abalone (n=500, 35.0 mm ± 2.2, 2 years old) were transferred from the hatchery “France Haliotis” (Plouguerneau, France) to the animal holding facility of LEMAR in June 2007 and used for all *in vivo* bacterial challenges.

Adult Manila clams, *R. philippinarum*, (30 to 40 mm) were collected from the natural clam bed of Bailleron Island in the Gulf of Morbihan (Southern Brittany, France) and maintained in tanks with an open seawater circuit.

***In vivo* bacterial challenges**

For the immersion challenges farmed abalone were placed in 5 L tanks with filtered (0.5 µm) seawater and maintained at 19°C. Abalone were exposed (or not) to 10^5 CFU.mL⁻¹ of the respective bacterium, for 24 hr. In all experiments, every test group (containing each 20 abalone) was performed in triplicate. For the injection challenges young abalone were anesthetized with 5 % ethanol, and a triplicate of each group of 10 animals was injected with 50 µl of bacterial suspension (10 to 10^7 bacteria per 50µl). Subsequently, abalone were maintained in filtered (0.5 µm) seawater at 19°C. For both types of challenges, seawater was renewed each day. Temperature was monitored on a daily basis, and dead abalone were counted and removed twice a day.

***In vitro* bacterial challenges**

Haemocytes – Abalone haemolymph was withdrawn from the cephalic sinus located at the anterior part of the foot muscle using a 25-Gauge needle and a 5 ml syringe. Clam hemolymph was similarly collected from the posterior adductor muscle using a 25-Gauge needle and a 1 ml syringe. Individual haemocyte concentration was quantified using a Malassez cell and adjusted in serum to 1×10^6 or 5×10^6 cells mL⁻¹ for use in each assay below. Cell suspensions were mixed with FSSW (control) or bacteria (haemocyte: bacteria ratio = 1:25) and used in parallel for the bacterial growth, ROS production, microscopy and western blot assays.

Haemocyte mortality – Aliquots of 100µl of each haemocyte suspension (5×10^6 cells mL⁻¹) were placed into individual wells (n= 3 per animal per condition) in a 96-well microplate for 15 min at 18°C before addition of FSSW (control) or bacteria (*V. harveyi* ORM4, ratio = 1:25 and 1:75). After 0, 1, 2, 3, 5, 7, 22 or 28 hours, 200 µl of Methyl Thiazolyldiphenyl-Tetrazolium (MTT) ($5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in FSSW) was added. Plates were incubated at 18°C for 1 hr before the addition of 100 µl of isopropanol-HCl (0.04 N). Optical density was measured at 540 nm with a reference wavelength of 620 nm [Lebel et al., 1996]. Results were expressed as the percentage of dead cells relative to that of control haemocytes (FSSW).

Non adherent cell ratio (CNA) assay – To examine the cytotoxicity of bacteria on haemocytes as previously described [Choquet et al., 2003], clam or abalone haemocytes were aliquoted (300 µl per well) into a 24-well microplate in the presence of FSSW (control) or bacteria (*V. harveyi* ORM4, LMG 7890, LMG 4044 or *V. tapetis* CECT 4600, ratio =1:25). After 3 h at 18°C, the supernatant was transferred into cytometer tubes containing 300 µl of 6 % formalin. Subsequently, samples were incubated with SYBR Green I fluorescent dye (Molecular Probes, 10^{-3} dilution of the commercial stock solution) for 30 min at room temperature. Samples were analyzed with a FACS-Calibur™ flow cytometer (Becton Dickinson). Results are expressed as the ratio of non-adherent cell number incubated with bacteria divided by the number of cells incubated with FSSW. A ratio larger than 1 is indicative of a cytotoxic effect on the haemocytes by the tested bacteria.

Bacterial mortality/growth –We examined the role of p38 MAPK on the ability of haemocytes to kill bacteria. To achieve this goal, 1ml of diluted haemolymph (1×10^6 cells mL⁻¹) was mixed with FSSW or bacteria (ratio 1:25 and 1:75) and 100µl aliquots were quickly transferred into 1.5ml tubes. The tubes were incubated at 18°C for 0, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h and 6 h in two independent experiments. The same protocol was followed for haemolymph treated with the p38 MAPK inhibitor, SB203580 (20 µM, added 10 min before bacterial contact). At each timepoint, supernatants were serially diluted in FSSW, plated in duplicate on LBS plates and incubated for 24 h at 28°C prior to counting bacteria.

Reactive Oxygen Species - production assay – The ability of abalone haemocytes to produce reactive oxygen species, in presence or absence of different bacterial strains, was measured by adapting the protocol previously described by Martello and Tjeerdema [Martello and Tjeerdema, 2001]. Aliquots (100 µl) of abalone haemocytes (1×10^6 cells mL⁻¹), in presence or absence of bacteria (ratio 1:25) and of the inhibitor SB203580 (20 µM f.c.), were dispersed into a white 96-well microplate. Just before measurement, a luminol working solution (25 µl of 1 mM luminol in KOH ($9.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) / boric acid ($7.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)) was added. The reactive oxygen species produced by the cells oxidize the luminol in a chemiluminescent reaction producing photons, which were measured each 10 minutes during 3 hours in a Mithras LB 940 luminometer (Berthold technologies). Controls with only bacteria or only cells were performed in parallel.

Microscopy – Diluted haemolymph (200 μl , 1×10^6 cells ml^{-1}) was incubated in presence (or absence) of SB203580, and in presence of *V. harveyi* ORM4 or *V. harveyi* LMG 7890. Cell and bacterial morphology were regularly examined with an inverted Leica DM-IRB microscope equipped with a Retiga 2000R Fast 1394 CC camera (QImaging) to observe bacterial growth and cell death or rounding.

Western blot analyses – Aliquots (100 μl , 1×10^6 cells ml^{-1}) of haemocyte solution were incubated with or without bacteria (ratio 1:25), in the presence or absence of the inhibitor SB203580 (20 μM f.c.). At each time point (see section Bacterial mortality/growth above), haemocytes were pelleted and resuspended in 100 μl of sample buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, to obtain whole haemocyte extracts. After boiling, haemocyte extracts were separated on 10 % SDS/PAGE gels according to Laemmli [1970] and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). The membranes were saturated during one hour in Tris Buffered Saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 1% bovine serum albumin (Sigma). Subsequently, they were incubated overnight with the mouse monoclonal anti-phospho-P38-Thr180/Tyr182 (1:1000) or the polyclonal rabbit anti-actin (1:2000) antibodies. Secondary peroxidase-conjugated antibodies (Biorad) were used at a 1:2000 (anti-mouse) and 1:5000 (anti-rabbit) dilution, respectively. Bands were visualized using the ECL chemiluminescence substrate according to the manufacturer's instructions (Amersham). Signals were quantified using the public domain ImageJ program (written by Wayne Rasband, NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

RESULTS

In vivo pathogenic effect of different *V. harveyi* strains

Two types of *V. harveyi* strains were used for the immersion challenge experiments (Table 1): three pathogenic strains, isolated from moribund abalone during abalone epidemics (strains ORM4, strain 92 and strain 53); and two non-pathogenic reference collection strains, LMG4044T (*V. harveyi* type strain) and LMG7890 (former *V. carchariae* type strain, *V. carchariae* is a junior synonym of *V. harveyi* [Gauger and Gomez-Chiarri, 2002]). This last strain was chosen as it is closely related to ORM4 [Nicolas et al., 2002].

The pathogenic strains (ORM4, strain 92 and strain 53) resulted in 80% of mortality within 5 days, whereas no losses were observed in abalone challenged with the reference collection strains (LMG 4044T and LMG 7890) during this time period (Figure 1A). Differential mortality was observed after injection of the tested strains. The LD₅₀ values of collection strains, LMG 4044 and LMG 7890, were 8.9×10^4 and 1.6×10^5 CFU. animal⁻¹, respectively, whereas that of the ORM4 strain was 2.5×10^2 CFU. animal⁻¹ (Figure 1A). For the highest doses of ORM4 (10^7 CFU. mL⁻¹), abalone mortality began only one day after inoculation; as little as 10 CFU. animal⁻¹ led to 80% mortality within 3 days (Figure 1B). In conclusion, a large difference was detected between pathogenic and non-pathogenic strains both in immersion and injection experiments.

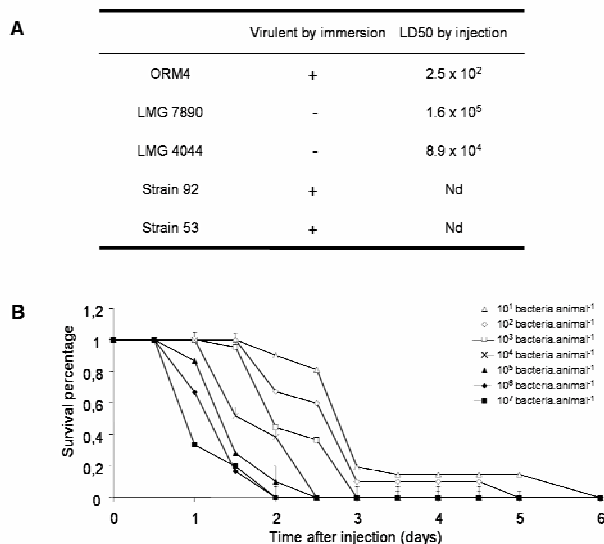


Figure 1: **A.** Immersion challenges and LD₅₀ determination (CFU. animal⁻¹) by injection challenges (after 2.5 days). Results are means \pm s.e. of 10 or 20 animals in triplicate, obtained in three independent experiments; **B.** Mortalities observed after intramuscular injection of different doses of ORM4 bacteria.

***In vitro* bacterial contact with haemocytes**

The effect of the pathogenic *V. harveyi* strain, ORM4, on haemocytes was evaluated by testing haemocyte viability and adherence capacity; two traits known from the literature to be affected by *Vibrio* infections. Bacterial dose did not influence haemocyte survival with up to 97% (s.d. 5.9%) surviving after 28 hours (Figure 2A). In addition, no obvious morphological changes or any release of adherent cells were observed after 3 hours of contact with *V. harveyi*, as shown by the non-adherent cell ratios (Figure 2B). *V. tapetis* on the contrary had a high cytotoxic effect on clam haemocytes (CNA = 9.1, s.d. 0.9) but not on abalone haemocytes (CNA = 1.1, s.d. 0.4). None of the *V. harveyi* strains we tested induced any loss of adherence (Non-adherent cell ratio above 1).

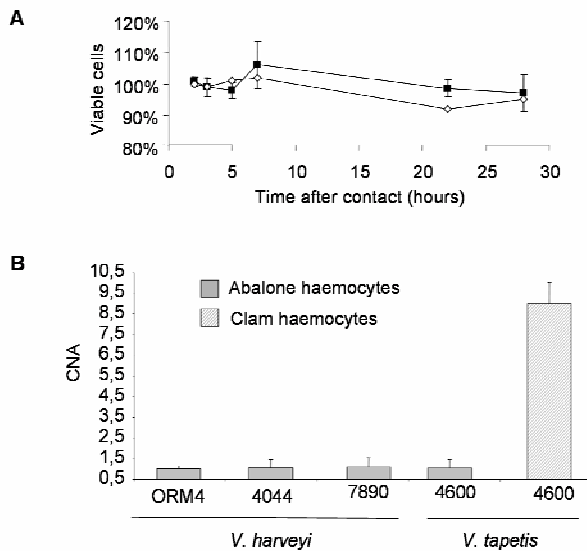


Figure 2: **A.** *In vitro* haemocyte mortality estimated with the MTT assay, upon incubation with *V. harveyi* ORM4. Squares represent an haemocyte:bacteria ratio = 1:25 and diamonds a ratio = 1:75. Mean \pm s.e. **B.** *In vitro* haemocytes CNA (ratio non adherent cells in presence of bacteria over non adherent cells in presence of seawater) after 3 hours of bacterial contact, measured by flow cytometry. Error bars represent three independent experiments.

To study the potential role of p38 MAP kinase in the early steps of signal transduction in abalone haemocytes triggered by bacterial *in vitro* challenges, p38 MAPK phosphorylation, corresponding to activation, was evaluated. The non-pathogenic *V. harveyi* strains, LMG 4044T and LMG 7890, strongly induced phospho-p38 MAPK after one hour of contact with a “tailing” of expression for up to 5 hours (Figure 3). *V. harveyi* ORM4, on the other hand, induced slower p38 MAPK phosphorylation kinetics and potentially to a lower level than the non-pathogenic strains. A peak of phospho-p38 appeared from 2 to 4 hours of contact (Figure 3). Observed kinetic differences between the strains, suggested that p38-MAPK phosphorylation could be implicated in the haemocyte response to *V. harveyi*.

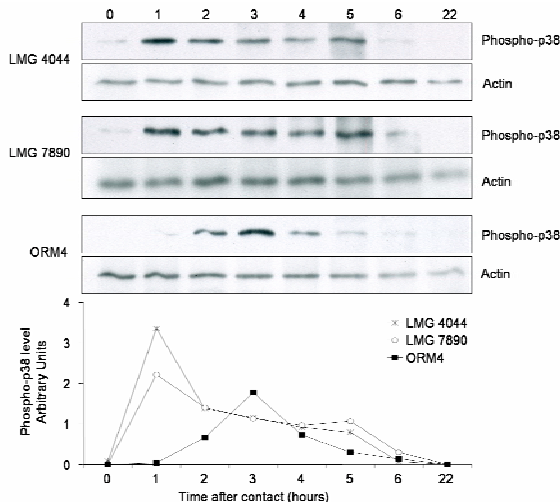


Figure 3: p38-MAPK activation in haemocytes. **(A)** Protein extracts of haemocytes incubated during a time period with different strains of *V. harveyi* (ORM4, LMG 7890 and LMG 4044) were separated on 10% SDS-PAGE gels, blotted and incubated with anti-phospho-p38 antibody. An anti-actin blot is shown as loading control. **(B)** Quantification of the immunoblots in the different experimental conditions.

To analyse in more detail the role of this p38 activation in the haemocyte killing, cells were treated (or not) with 10 μ M of the p38 MAPK inhibitor, SB253080, and both haemocyte and bacterial survival was estimated each hour during these *in vitro* contacts. As shown in [Figure 4A](#), p38 MAPK phosphorylation is largely reduced when haemocytes are incubated with ORM4 and inhibitor. In six hours, the *V. harveyi* ORM4 concentration increased 1 log unit (0.05, s.d.) which gives a generation time of about 45 minutes in haemolymph ([Figure 4B](#)). The non-pathogenic strain LMG 7890, however, didn't seem to grow well in complete haemolymph, and the microbes were apparently rapidly destroyed by the haemocytes ([Figure 4B](#)). In presence of the SB203580 inhibitor, a little growth of the LMG 7890 strain was observed (from $1.5 \cdot 10^7$ to $5 \cdot 10^7$ CFU.ml⁻¹ in 6 hours, [Figure 4B](#)). *V. harveyi* ORM4 grew well in the presence of haemocytes independent of the presence or absence of the p38-MAPK inhibitor ([Figure 5](#)). Similar observations were done by microscopy, confirming that LMG7890 only multiplies in the presence of p38-MAPK inhibitor ([Figure 5](#), 7890 + SB lanes) whereas ORM4 is able to grow both in presence or absence of SB253080 ([Figure 5](#), ORM4 lanes).

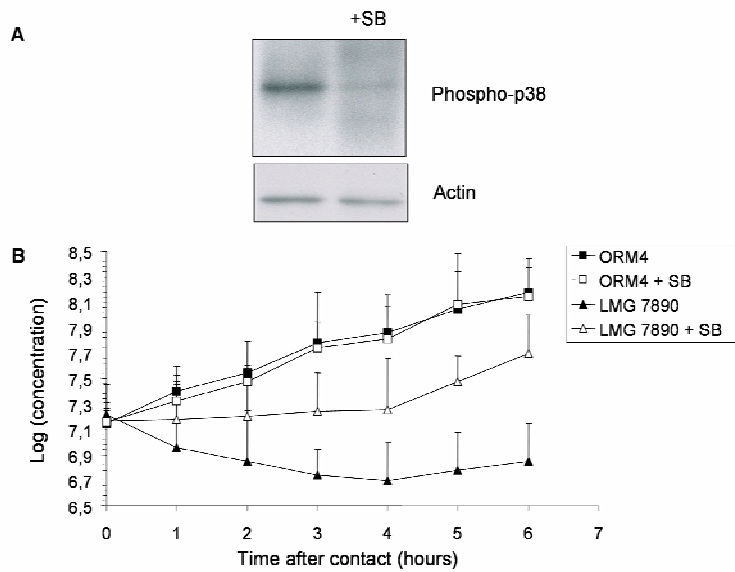


Figure 4: Effect of the p38 MAPK inhibitor, SB203580, on **A.** p38 phosphorylation; **B.** bacterial growth/mortality (LMG 7890 and ORM4 strains) in contact with abalone haemocytes at 18°C. Bacterial concentration was estimated each hour by plating in triplicate. Results are means (+ s.d.) of two independent experiments.

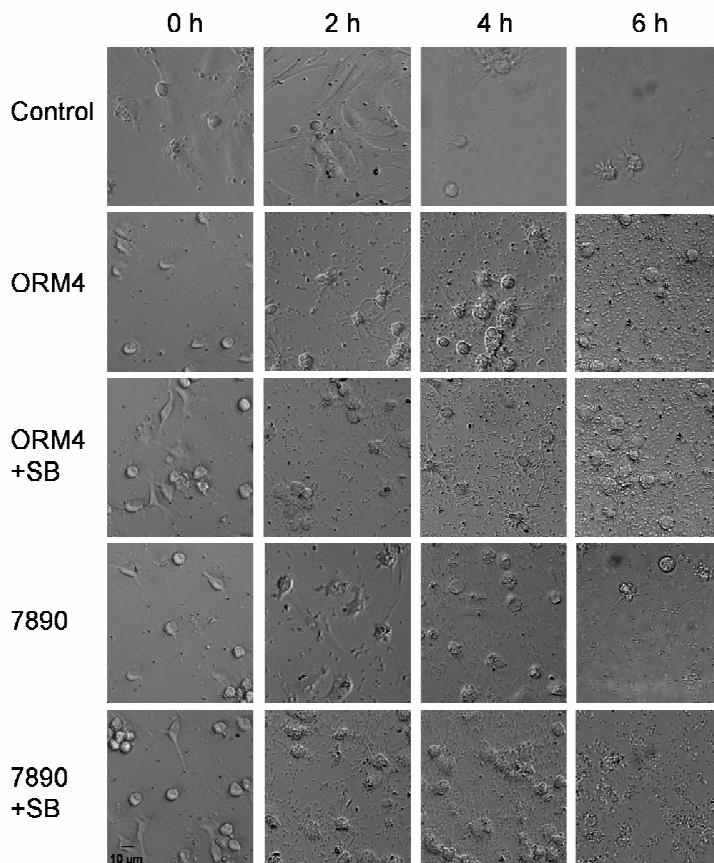


Figure 5: Cellular morphology and bacterial presence or absence, observed by phase contrast microscopy, at the indicated time points. Cells were incubated at 18°C in presence of the *V. harveyi* strains LMG 7890 or ORM4, and presence or absence of the p38 MAPK inhibitor, SB-203580 (SB).

To investigate whether abalone haemocytes produced an oxidative burst when in contact with one of the *V. harveyi* strains, and to verify a possible role of p38 MAPK activation in this process, ROS production was measured. Photon emission was detected in the presence of the non-pathogenic LMG 7890 strain, and was completely inhibited by SB203580 (Figure 6). In comparison, only a very small induction of ROS was measured in presence of the ORM4 strain without SB203580 (Figure 6).

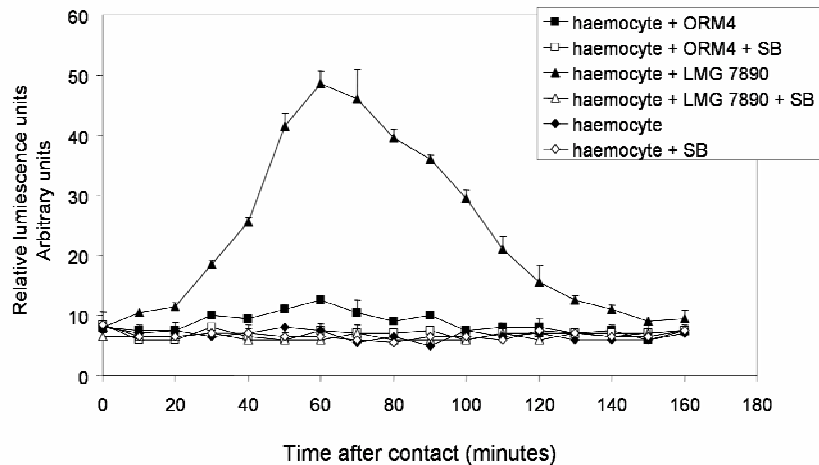


Figure 6: ROS production estimated by the luminol chemiluminescence assay in abalone haemocytes after bacterial contact (1:25), in presence or absence of the p38 MAPK inhibitor, SB-203580 (SB). Results are expressed as relative luminescence units and are the means of triplicates of two independent experiments (\pm s.d.).

DISCUSSION

To be an efficient pathogen, able to proliferate in haemolymph in presence of mollusc immune cells, *V. harveyi* must prevent activation of the bactericidal activities in these cells. The present study demonstrates for the first time that pathogenic versus non-pathogenic *V. harveyi* cells differ in their “interaction” with the host’s defence. The pathogenic ORM4 inhibits efficiently the bactericidal response, probably, in part, through a modified or a reduction in p38-MAPK activation, in terms of both kinetics and intensity. *V. harveyi* ORM4 is able to grow in haemolymph and to inhibit ROS production in contrast to the non-pathogenic strains.

To evade haemolymph bactericidal activity, vibrios are known to produce compounds that inhibit phagocytosis, as illustrated by the extracellular products of *V. aesturianus*, an oyster pathogen [Labreuche et al., 2006] or the capsules of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, which were suggested to prevent bacterial degradation by haemocytes [Falkind-Jerkerus et al., 2005; Genthner et al., 1999; Hsieh et al., 2003; Qadri et al., 2005]. Another rather direct way to avoid phagocytosis is to damage haemocytes [Cheng, 1975; Labreuche et al., 2006], or to prevent the oxidative burst associated with phagocytosis [Pruzzo et al., 2005]. This strategy is employed by *V. anguillarum* [Bramble and Anderson, 1999] or *Vibrio* sp. strain S322 [Lambert and Nicolas, 1998]. Finally, bacteria can overcome the defence response through a deregulation of signalling pathways involved in immune cell activation [Canesi et al., 2005; Pruzzo et al., 2005; Rosenberger and Finlay, 2003]. *Bacillus anthracis* lethal factor (LF) induces an inhibition of p38-MAPK activation in macrophages by cleaving the amino-terminal extensions of the MKK3 and MKK6 MAPK Kinases which normally activate p38-MAPK [Park et al., 2002]. *Erlichia chaffeensis*, an obligatory intracellular Gram-negative bacterium infecting human monocytes or macrophages, also causes a down-regulation of p38-MAPK activation [Lin and Rikihisa, 2004].

We show here that pathogenic and non-pathogenic *V. harveyi* differ in their capacity to kill abalone during bath immersion and injection challenges, in their capacity to grow in the presence of haemocytes, and in their ability to activate abalone immune cells. An efficient immune response may in this case be defined on the basis of the results obtained with the non-pathogenic strains: After a

rapid p38-MAPK activation which peaks within 1 hour, bacteria are damaged and eliminated through phagocytosis and ROS production. This “normal” abalone haemocyte response was shown to be impaired in presence of the p38-MAPK inhibitor, confirming the role of this MAPK pathway proposed in other models for mediating molluscan phagocytosis and ROS production [Canesi et al., 2002a; Humphries and Yoshino, 2006; Iakovleva et al., 2006a]. Canesi *et al.* (2002) first implicated p38-MAPK in bacterial elimination in mussel haemolymph, and showed that it was inhibited in presence of the specific inhibitor, SB253080 [Canesi et al., 2002b]. Similar implications of p38-MAPK in phagocytosis were subsequently noticed for *Biomphalaria glabrata* and *Lymnaea stagnalis* [Zelck et al., 2007].

The pathogenic *V. harveyi* ORM4, however, when compared with the non-pathogenic strains, induces less p38 phosphorylation, and the activation occurs later (between 2 to 4 hours post-infection). This bacterium is able to grow rapidly in haemolymph (has a short generation time) and has the ability to not activate ROS production, and all this, apparently without any detectable cytotoxic effects on the haemocytes.

In conclusion, we show for the first time that the p38 MAPK pathway is implicated in the “normal” abalone haemocyte response against a non-pathogenic bacterial intruder. Pathogenic *V. harveyi*, however, can efficiently circumvent the abalone’s immune response, by inhibiting or avoiding haemocyte bactericidal activities, in part, through a modification of the p38-MAPK signalling pathway. However, as the virulence factors playing key roles in this strain’s pathogenicity strategy are still unknown, their identification and characterization has to be undertaken to elucidate the mechanisms this bacterium employs for efficient survival within a host.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank IFREMER “La Tremblade” for the generous gift of *V. harveyi* strains, 53 and 92. This study was supported by ‘France Haliotis’ SCEA, and the “Région Bretagne”. This is contribution n°XXX of the European Institute for Marine Studies (Brest, France).

REFERENCES

- Austin B, Zhang XH (2006): *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol* 43:119-24.
- Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B (2004): Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 198:149-68.
- Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, Ventosa A (1996): *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Dis Aqu Organ* 46:480-484.
- Bramble LH, Anderson RS (1999): Lack of involvement of reactive oxygen species in the bactericidal activity of *Crassostrea virginica* haemocytes in contrast to *Morone saxatilis* phagocytes. *Fish Shell Immunol* 9:109-123.
- Canesi L, Betti M, Ciacci C, Lorusso LC, Gallo G, Pruzzo C (2005): Interactions between *Mytilus* haemocytes and different strains of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1 El Tor: role of kinase-mediated signalling. *Cell Microbiol* 7:667-74.
- Canesi L, Betti M, Ciacci C, Scarpato A, Citterio B, Pruzzo C, Gallo G (2002a): Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev Comp Immunol* 26:325-34.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C (2002b): Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech* 57:469-76.
- Canesi L, Scarpato A, Betti M, Ciacci C, Pruzzo C, Gallo G (2002c): Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Mar env res.* 54:547-51.
- Cheng TC (1975): Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *An NY Acad Sciences* 266:343-379.

- Cheng TC (1981): Bivalves. In Ratcliffe NA, Rowley AF (eds): "Invertebrate Blood Cells." London: Academic Press, pp 233-299.
- Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas JL, Paillard C (2003): Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Organ* 57:109-116.
- Cowan KJ, Storey KB (2003): Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* 206:1107-1115.
- Falkind-Jerkerus S, Felici F, Cavalieri C, Lo Passo C, Garufi G, Pernice I, Islam MM, Qadri F, Weintraub A (2005): Peptides mimicking *Vibrio cholerae* O139 capsular polysaccharide elicit protective antibody response. *Microbes infect* 7:1453-60.
- Gauger EJ, Gomez-Chiarri M (2002): 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Dis Aqu Organ* 52:39-46.
- Genthner FJ, Volety AK, Oliver LM, Fisher WS (1999): Factors influencing in vitro killing of bacteria by hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Appl Env Microbiol* 65:3015-3020.
- Handlinger J, Carson J, Donachie L, Gabor L, Taylor D (2005): Bacterial Infection in Tasmanian Farmed Abalone: Causes, Pathology, Farm Factors and Control Options. In P. Walker RLaMGB-R (ed): "Diseases in Asian Aquaculture V."
- Hooper C, Day R, Slocombe R, Handlinger J, Benkendorff K (2007): Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish shellf immunol* 22:363-79.
- Hsieh YC, Liang SM, Tsai WL, Chen YH, Liu TY, Liang CM (2003): Study of capsular polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect immun* 71:3329-36.
- Humphries JE, Yoshino TP (2003): Cellular Receptors and Signal Transduction in Molluscan Hemocytes: Connections with the Innate Immune System of Vertebrates. *Int Comp Biol* 43:305-312.
- Humphries JE, Yoshino TP (2006): Schistosoma mansoni excretory-secretory products stimulate a p38 signalling pathway in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Int J Parasitol* 36:37-46.
- Iakovleva NV, Gorbushin AM, Storey KB (2006a): Modulation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) activity in response to different immune stimuli in haemocytes of the common periwinkle *Littorina littorea*. *Fish shellf immunol* 21:315-24.
- Iakovleva NV, Gorbushin AM, Zelck UE (2006b): Partial characterization of mitogen-activated protein kinases (MAPK) from haemocytes of the common periwinkle, *Littorina littorea* (Gastropoda: Prosobranchia). *Fish shellf immunol* 20:665-8.
- Labreuche Y, Soudant P, Goncalves M, Lambert C, Nicolas JL (2006): Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 30:367-79.
- Laemmli UK (1970): Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambert C, Nicolas JL (1998): Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *J of Inv Pathol* 71:53-63.
- Lebel JM, Giard W, Favrel P, Boucaud-Camou E (1996): Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol Cell* 86:67-72.
- Lin M, Rikihisa Y (2004): *Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-KappaB, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes. *Cell Microbiol* 6(2):175-186.
- Martello LB, Tjeerdema RS (2001): Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone. *Aquat Tox* 51:351-362.
- Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P (2000): Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett* 486:185-90.
- Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurie J, Thebault A (2002): *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis Aquat Organ* 50:35-43.
- Paillard C, Maes P (1990): Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* : pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1990, 310 (série III), 15-20.

- Park JM, Greten FR, Li Z-W, Karin M (2002): Macrophage Apoptosis by Anthrax Lethal Factor Through p38 MAP Kinase Inhibition. *Science* 297:2048-2051.
- Pruzzo C, Gallo G, Canesi L (2005): Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ Microbiol* 7:761-72.
- Qadri F, Svennerholm AM, Shamsuzzaman S, Bhuiyan TR, Harris JB, Ghosh AN, Nair GB, Weintraub A, Faruque SM, Ryan ET, Sack DA, Calderwood SB (2005): Reduction in capsular content and enhanced bacterial susceptibility to serum killing of *Vibrio cholerae* O139 associated with the 2002 cholera epidemic in Bangladesh. *Infect Immun* 73:6577-83.
- Rosenberger CM, Finlay BB (2003): Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:385-396.
- Sawabe T, Inoue S, Fukui Y, Yoshie K, Nishihara Y, Miura Y (2007): Mass mortalities of Japanese abalone *Haliotis diversicolor supertexta* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes Environ* 22:300-308.
- Seger R, Krebs EG (1995): The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9:726-35.
- Sparks AK, Morado JF (1988): Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. In Fisher WS (ed): "Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs." Bethesda, MD: American Fisheries Society, pp 139-152.
- Travers MA, Da Silva PM, Le Goïc N, Marie D, Donval A, Huchette SMH, Koken M, Paillard C (2008): Morphologic, cytometric and functional characterization of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shell Immunol* 24:400-411.
- Zelck UE, Gege BE, Schmid S (2007): Specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase and PI3-K pathways impair immune responses by hemocytes of trematode intermediate host snails. *Dev Comp Immunol* 31:321-331.

pVCR1, a plasmid responsible for the virulence of *Vibrio harveyi* strain ORM4 towards the European abalone, *Haliotis tuberculata*

Article 6: En préparation

Marie-Agnès Travers^{1,2}, Annaïck Barbou², Sylvain Huchette¹, Christine Paillard^{2γ} and Marcel Koken^{2γ}

1 France Haliotis, Kerazan, Lilia, 29880 Plouguerneau, France

2 Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin, CNRS UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

* Corresponding author. E-Mail: marcel.koken@univ-brest.fr
Tel: +332 98 49 88 36
Fax: +332 98 49 86 45

^γ*M.K. and C.P. should be considered as last co-authors*

ABSTRACT

Vibrio harveyi is a marine pathogenic bacterium which can cause fatal disease in many vertebrates and invertebrates, among which the gastronomically important gastropod, *Haliotis tuberculata*. Since 1997, epizooties have regularly decimated up to 80 % of the French wild and farm stocks of this abalone, and *V. harveyi* was consistently isolated.

Here, for the first time, an 18kb plasmid is described which is systematically present in only the pathogenic strains of abalone. Via electroporation the plasmid, pVCR1, was introduced into a non-pathogenic strain, which rendered virulent towards abalone. This proved that the plasmid is carrier of the principal virulence factors of this bacterium.

INTRODUCTION

Vibrio harveyi is an opportunistic bacterial pathogen which can affect a large range of marine animals. It has previously been isolated from diseased sharks and bony fish, as well as from shrimps and abalone [1]. *V. harveyi* infections generally result in a progressive loss of muscular strength and finally in a hemorrhagic septicaemia leading to the animal's death. Even if disease signs seem to be common to various strains, a virulence specificity for the different isolates towards their natural hosts has been demonstrated by cross-challenges of Ecuador and Thailand shrimps infected with their respective isolates (reviewed in [2]). *V. harveyi* virulence is suggested to be linked to horizontal gene transfer via plasmids or bacteriophages [3]. This idea is supported by the isolation of host-specific bacteriophages from two *V. harveyi* strains which confer virulence towards either salmon or shrimp: VHML (*V. harveyi* myovirus-like, salmon-specific) [4-6] and VHS1 (*V. harveyi* siphovirus-like, shrimp (which species-specific) [7-9].

Plasmids are common virulence carriers in bacteria. In *Vibrios*, for instance, the *V. vulnificus* pR99 plasmid is responsible for virulence in eels, causing resistance to the host's phagocytosis machinery and serum factors [10, 11]. The pJM1 plasmid of *V. anguillarum* confers virulence by producing siderophores [12, 13] and the *V. nigripulchritudo* pSFn1 plasmid is correlated with the level of virulence toward shrimps via an unknown mechanism [14].

Here, the isolation of an 18 kb plasmid, named pVCR1, is reported, from all *V. harveyi* isolates (n=7) which display virulent phenotypes towards the European abalone. Via gene-transfer the plasmid was introduced into non-virulent *V. harveyi* strains, and pathogenicity could be transmitted supporting the prominent role this plasmid plays in the strain's virulency towards *Haliotis tuberculata*.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains – The different *Vibrio harveyi* strains used in this study are presented in [Table 1](#). Briefly, eight strains are from collection and ten come from moribund abalone (two from Japan, and eight from France). Bacteria were cultured at 28°C in Luria Bertani broth with additional salt (LBS, 20g.L⁻¹ NaCl, f.c.).

Abalone challenges – Abalone (34.0 mm ± 2.0, 2 years old) were transferred from the “France Haliotis” hatchery (Plouguerneau, France) to the laboratory in December 2007. Abalone were anesthetized with 5% ethanol in seawater, and triplicates of each test group (consisting of 10 animals each) was injected intramuscularly with 50 µl of bacterial suspension (10⁴ bacteria. animal⁻¹). Abalone were maintained in 5 L tanks with filtered (0.5 µm) and aerated seawater which was renewed daily. Moribund abalone were counted and removed twice a day.

Plasmid isolation by cesium chloride gradient purification

Plasmid DNA was purified on a cesium chloride gradient according to Sambrook [15]. Briefly, a 2 liter culture of ORM4 was grown overnight at 28°C in LBS, and a classical Birnboim-Doly extraction was performed. After complete re-suspension of the pellet, 4.12 g of CsCl₂ and 0.5 ml of an ethidium-bromide stock solution (10 mg/ml) was added into Optiseal™ 4.9 ml tubes (Beckman) which were subsequently topped off with water. After 48 hours of ultracentrifugation at 43,000 rpm at 20°C in a Beckman NVT 65.2 rotor, the plasmid bands were extracted. After removal of ethidiumbromide, DNA was precipitated, re-

suspended, RNase A and Proteinase K treated, phenolized and again ethanol precipitated using standard procedures [15].

Restriction digest of 2.5 µg of purified plasmid were performed according to the manufacturer's recommendations and migrated on 0.8 % agarose gels. For subcloning, fragments were excised and purified using a Qiaquick™ gel extraction kit (Qiagen), before ligation into a modified Bluescript plasmid [16], transformation into *E. coli* X-gold cells (Stratagene) and plating on XGal agar plates. Insert-containing plasmids were isolated by a classical alkaline lysis method [15] and sequenced by Macrogen (Corea) using M13 forward and reverse primers.

Pulsed field gel electrophoresis – 50 µl of a 1% low melting point agarose (LMP, Seakem) solution was added to a 10 µl restriction digest. After gelling, plugs were placed into the wells of a 1% gigaphor^R agarose gel (Eurobio, réf. 018587). Migration was carried out in a CHEF-DRIII system (Biorad) in 0.5X Tris-borate-EDTA buffer (TBE, sigma) for 15 h at 14°C with 6 V/cm, a switch angle of 120°, and increasing pulsed times from 1 to 12 seconds, according to the manufacturer's instructions. After migration, DNA was visualized by ethidium bromide staining (BET 10 µg. ml⁻¹ f.c. for 30 min before an 1 h wash in distilled water).

DNA extraction, plasmid PCR and plasmid copy-number quantification by QPCR

Total DNA was extracted by the proteinase K / phenol method [17], and about 10 ng of DNA was used as template for PCR reactions. A 160 bp fragment from pVCR was PCR amplified (5 min 95°C, 35 cycles of 30 s 95°C, 30 s 62°C, 30 s 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C) using the 5F2 (forward primer 5' CTANNNNNNNNNNNNNNNNNNN) and the 5R2 primers (5'CAANNNNNNNNNNNNNNNNNNN). PCR products were visualised on a 1.5% agarose gel.

Plasmid copy numbers were determined by quantitative real-time PCR (Applied biosystem 7300), by measuring on five different DNA template concentrations the ratio of plasmid sequence 02001 (Forward primer 5' TTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN, reverse primer 5' GCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN) to the chromosomal *toxR* gene (forward primer 5' CACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN, reverse primer 5' TGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN), as described by Providenti *et al.* [18].

Electroporation (according to [19]) – Overnight cultures of the bacterial strains, LMG 7890 and LMG 4044T were diluted 1:100 into 146 ml of fresh LBS medium and grown at 28°C to the mid-exponential phase (OD at 490 nm = 0.5). Cells were quickly chilled on ice and washed in 40 ml ice-cold EP buffer (272 mM sucrose, 1 mM MgCl₂, 7 mM KH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer, pH 7.4) with a centrifugation step at 2000 g for 20 min at 4°C. Finally cells were re-suspended in 7.3 ml of cold EP, divided in 200 µl aliquots, and quick-frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C.

Before electroporation, 200 µl cells were rapidly thawed at 37°C, transferred into a chilled electroporator cuvette (2mm electrode distance) containing 1 µg of purified plasmid DNA, mixed and kept on ice for 15 min. Samples were pulsed with a time constant of 25 ms (25 µF capacitance, 1000Ω) at 1.5 kV with a Gene Pulser II electroporation system (Biorad), and as quick as possible diluted with 0.8 ml of 28°C pre-warmed LBS. The cuvettes were incubated at 28°C for 1 hour. Dilutions were plated on LBS agar and incubated for 24-36 hours at 28°C. Positive-clone screening was done by PCR using specific primers 5F2-5R2.

RESULTS

Characterization of the pVCR1 megaplasmid of the pathogenic abalone *V. harveyi* reference strain, ORM4

In a routine screen the presence of a large plasmid was observed in the pathogenic *V. harveyi* ORM4 strain. To verify whether this plasmid could be implicated in the bacterial virulence towards abalone, sequence information had to be obtained and transfers into non-virulent strains were envisaged. Therefore a large quantity was isolated on cesium chloride gradients, and to estimate its size, the plasmid DNA was digested with different restriction enzymes. *Hind* III digestion shown in Fig. 1 liberated 7 bands. The relative *Hind* III fragment sizes (8.5 kb + 5.5 kb + 2.2 kb + 0.8 kb + 0.5 kb + 0.3 kb + 0.2 kb) gave an apparent molecular size of about 18 kb (Figure 1A, 1B). Other digests (*Pvu* II and *Pst* I (Fig 1B), *Sal*I, *Pme*I, *Eco*RI (not shown)) corroborated this estimation. Many of the fragments obtained in these digestions were cloned and sequenced. From the nucleotide sequence (Accession number XXX), PCR and QPCR amplification regimes were established and used for plasmid detection and quantification.

Distribution of pVCR1 in different *V. harveyi* strains

Once the pVCR1 plasmid was found in ORM4, DNAs was extracted from a large panel of strains isolated from seawater, moribund abalone or other marine animals. Migration of uncut DNA and pVCR1-specific PCR indicated the presence of pVCR1-like plasmids, only in the seven strains isolated since 1998 from moribund abalone (Figure 2).

Restriction analysis of these plasmids from the 7 moribund abalone isolates was performed. This clearly demonstrated that all isolates harbour very similar plasmids although the isolates had clearly different geographic and timely origins (Figure 3). The plasmid copy number in the 6 isolates was determined by quantitative real-time PCR, and estimated to vary between 5.0 ± 2.6 and 9.1 ± 2.7 copies. These differences are not statistically significant and the plasmid copy number of pVCR1 is probably close to 8 copies per cell (Table 2).

Plasmid can confer virulence

To verify whether the pVCR1 plasmid is implicated in *V. harveyi* virulence, we electroporated a non-pathogenic *V. harveyi* strain, LMG 7890 (Travers, submitted) with the original pVCR1 plasmid. Positive clones were isolated using a PCR-screen. The electroporation efficiency was rather high (6 %) for a non-selection regime and several LMG7890 clones containing pVCR1 were selected for further analysis (Figure 4). By intramuscular injection of abalone the transformed clones were shown to be as virulent for abalone as the ORM4 parental strain, in comparison with wild-type LMG 7890 or seawater.

DISCUSSION

In this study, a plasmid was isolated from the pathogenic ORM4 strain and partially sequenced. In contrast to the non-pathogenic strains, all strains isolated thus far as pathogenic for the European abalone were shown to harbour this 18kb plasmid. Moreover, by transferring pVCR1 into a non pathogenic strain, we were able to demonstrate that the plasmid is implicated in the bacterial virulence.

Vibrio bacteria are very diverse and found in many different environments. They can colonize fish and marine invertebrates, can be associated with plankton and algae, and have the ability to form biofilms on biotic and abiotic surfaces which is essential for their environmental persistence [20]. *V. harveyi* is present in many (mainly warm water) marine habitats, all over the world, and displays a very large host range. This procaryote can infect cartilaginous and

bone fish, crustaceans, mainly shrimps, and molluscs, in particular different species of abalone. The different isolates are phenotypically extremely diverse, and very host specific. In a previous study (Travers, Submitted), it was demonstrated that two *V. harveyi* strains, virulent for shrimp, were not virulent in abalone. The non-virulent strains are rapidly recognized and destroyed by the abalone immune cells, while the virulent strains lead to a slower, shorter and apparently weaker activation of the p38-MAPK pathway, involved in the activation of phagocytosis and reactive oxygen species production. The genetic basis for this virulence-specificity is thus far unknown but could well be linked to the pVCR1 plasmid.

The concept that *V. harveyi* isolates show virulence-specificity toward a particular host has been suggested by Le Groumellec (1995). Moreover, the diversity of phages [4, 8, 21, 22] that were encountered in different isolates has led authors to suggest that *V. harveyi* virulence may be linked to mobile genetic elements such as plasmids and phages.

Plasmids are common in *vibrios* and about 27 plasmids are actually completely sequenced, some of which are known to carry the virulence phenotype. For instance, pJM1 (65 kb) was shown to confer virulence to the marine fish pathogen *V. anguillarum* [12, 23] as it encodes the important siderophore complexes [13].

Similarly, the pR99 plasmid (68 kb), coding for a member of the pathogenicity-associated RTX toxin family and the metalloprotease Vvp, confers virulence to *V. vulnificus* [10]. In *V. harveyi*, plasmids have already been detected [24], and even an 89kb plasmid, pVIBHAR, has been sequenced (Bassler, unpublished, genbank accession n°: NC_009777), pVCR1 is however the first *V. harveyi* plasmid, directly responsible for a well-defined virulence phenotype.

This plasmid was only detected in the *V. harveyi* isolates pathogenic for European abalone, but not in all other strains we tested, suggesting a complete concordance between plasmid presence and virulence. Abalone epizooties, linked to *V. harveyi*, have also been reported in Australia and Japan. The Japanese strains S35 and S20, both isolated from *H. discus hannai* do not contain any detectable plasmids and pVCR1-specific PCRs were negative. More importantly these strains appeared non-virulent towards *H. tuberculata* (Travers, unpublished). This again underlines that the virulence mechanisms of these strains differ considerably and are apparently totally host-strain-specific and in the case of ORM4, plasmid-encoded.

The importance of pVCR1 for *V. harveyi* virulence in European abalone was proven by the electrotransfer into non-pathogenic strains. Please note that the plasmid was able to remain in these strains without any selective pressure, indicative for a natural conservation in *V. harveyi*. The transformed non-pathogenic strains became virulent towards abalone, confirming the role of the megaplasmid in pathogenicity. Complete plasmid sequencing is actually underway which certainly will elucidate part of the virulence mechanisms of this important abalone pathogen and provide us with the tools needed to analyse them in detail.

Acknowledgements

Authors kindly acknowledged IFREMER “La Tremblade” and “Brest” for the generous gift of *V. harveyi* strains. We also thank Dr T. Sawabe (Laboratory of Microbiology at Faculty of Fisheries, Hokkaido University) for generous gift of Japanese strains, and Drs. E.A. Meighen and C. Miyamoto (McGill Faculty of Medicine, Biochemistry Dept. Montreal, Canada) for their generous gift of the B392 strain. This study was supported by ‘France Haliotis’ SCEA, and the “Région Bretagne”. This is contribution n°XXX of the European Institute for Marine Studies (Brest, France).

REFERENCES

1. Austin, B. and X.H. Zhang, *Vibrio harveyi: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates*. Letters in Applied Microbiology, 2006. **43**(2): p. 119-24.
2. Saulnier, D., et al., *Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review*. Aquaculture, 2000. **191**(1-3): p. 133-144.
3. Pizzutto, M. and R.G. Hirst, *Classification of isolates of Vibrio harveyi virulent strains to Penaeus monodon larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting*. Dis Aquat Organ, 1995. **21**: p. 61-68.
4. Oakey, H.J. and L. Owens, *A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of Vibrio harveyi in tropical Australia*. J Appl Microbiol, 2000. **89**(4): p. 702-9.
5. Oakey, H.J., B.R. Cullen, and L. Owens, *The complete nucleotide sequence of the Vibrio harveyi bacteriophage VHML*. J Appl Microbiol, 2002. **93**(6): p. 1089-98.
6. Munro, J., et al., *Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of Vibrio harveyi*. Dis Aquat Organ, 2003. **54**(3): p. 187-94.
7. Puiprom, O., *Characterization of a bacteriophage VHS1 that increases the virulence of Vibrio harveyi to shrimp*. 2003, Thesis of the Mahidol University.: Bangkok, Thailand.
8. Pasharawipas, T., et al., *Partial characterization of a novel bacteriophage of Vibrio harveyi isolated from shrimp culture ponds in Thailand*. Virus research, 2005. **114**(1-2): p. 63-9.
9. Pasharawipas, T., N. Wetchakit, and S. Sriurairatana, *The cycle for a Siphoviridae-like phage (VHS1) of Vibrio harveyi is dependent on the physiological state of the host*. Virus research, 2008. **In Press, Corrected Proof**.
10. Lee, C.T., et al., *A common virulence plasmid in biotype 2 Vibrio vulnificus and its dissemination aided by a conjugal plasmid*. Journal of bacteriology, 2008. **190**(5): p. 1638-48.
11. Valiente, E., et al., *Role of the virulence plasmid pR99 and the metalloprotease Vvp in resistance of Vibrio vulnificus serovar E to eel innate immunity*. Fish & Shellfish Immunology, 2008. **24**(1): p. 134-141.
12. Crosa, J.H., *A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen Vibrio anguillarum specifies an iron-sequestering system*. Nature, 1980. **284**(5756): p. 566-8.
13. Di Lorenzo, M., et al., *Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen Vibrio anguillarum strain 775*. Journal of bacteriology, 2003. **185**(19): p. 5822-30.
14. Reynaud, Y., et al., *Correlation between detection of a plasmid and high-level virulence of Vibrio nigripulchritudo, a pathogen of the shrimp Litopenaeus stylirostris*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(10): p. 3038-47.
15. Sambrook, J. and D. Russel, *Molecular cloning : a laboratory manual*. Vol. 3V. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. Borovkv, A.Y. and M.I. Rivkin, *XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products*. Biotechniques, 1996. **22**: p. 812-814.
17. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning : a laboratory manual*. Vol. 3V. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

18. Providenti, M.A., et al., *The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR*. J Microbiol Methods, 2006. **65**(3): p. 476-87.
19. Hamashima, H., M. Iwasaki, and T. Arai, *A simple and rapid method for transformation of Vibrio species by electroporation*, in *Methods in Molecular Biology*, N. J.A., Editor. 1995, Humana Press Inc: Totwa, NJ.
20. Thompson, F.L., T. Iida, and J. Swings, *Biodiversity of vibrios*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(3): p. 403-31.
21. Shivu, M.M., et al., *Molecular characterization of Vibrio harveyi bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India*. Environ Microbiol, 2007. **9**(2): p. 322-31.
22. Chrisolite, B., et al., *Distribution of luminescent Vibrio harveyi and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India*. Aquaculture, 2008. **275**: p. 13-19.
23. Crosa, J.H., L.L. Hodges, and M.H. Schiewe, *Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen Vibrio anguillarum*. Infection and Immunity, 1980. **27**(3): p. 897-902.
24. Teo, J.W., A. Suwanto, and C.L. Poh, *Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of Vibrio harveyi*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2000. **44**(5): p. 1309-14.

Table 1: *V. harveyi* strains used in this study with their geographic and host origins.

<i>V. harveyi</i> strains	Origin	References
ORM4	moribund abalone, France, 1998	Nicolas <i>et al.</i> , 2002
04/017	moribund abalone, farm, France, 2004	this study
04/092	moribund abalone, farm, France, 2004	Travers <i>et al.</i> soumis
04/107	moribund abalone, farm, France, 2004	this study
05/053	moribund abalone, field, France, 2005	Travers <i>et al.</i> soumis
05/074	moribund abalone, field, France, 2005	this study
07/023	moribund abalone, field, France, 2007	Travers <i>et al.</i> soumis b
S20	moribund abalone, Japan, 2002	Sawabe <i>et al.</i> , 2007
S35	moribund abalone, Japan, 2002	Sawabe <i>et al.</i> , 2007
LMG 4044 T	dead amphipod (<i>Talorchestia</i> sp.), Massachusetts USA,	F. Johnson 1965
LMG 7890	brown shark (<i>Carcharinus plumbeus</i>), Baltimore, USA	R. Colwell 1982
LMG 10946	prawn muscle (<i>Palaemon indicus</i>)	N. Velnkar 1985
LMG 10948	seawater enrichment, Off coast Oahu Hawaiï, USA	P. Baumann 1972
LMG 11755	shark, mouth, Bahamas	P. Brayton
LMG 16863	oyster, Spain	M. Pujalte 1989
LMG 19714	japanese horse mackerel (<i>Trachurus japonicus</i>), Japan	Y. Iwamoto 2000
MEIGH B392	Brittany, France	Reichelt & Baumann, 1972

Table 2: Estimation of the plasmid copy number by Q-PCR in the different isolates from moribund abalone in France, and in the collection strain LMG 7890 (wild-type and pVCR1 electroporated). Results are means (\pm standard error) of at least two DNA independent extractions and three independent real-time quantitative PCR analyses; each dilution point has been analyzed in triplicate.

<i>V. harveyi</i> strains	pVCR1 copy number
ORM4	7.7 \pm 1.4
04/017	6.3 \pm 2.4
04/092	8.8 \pm 3.6
04/107	7.8 \pm 3.3
05/053	5.0 \pm 2.6
05/074	9.1 \pm 2.7
LMG7890	0
LMG7890 + pVCR1	7 \pm 1.8

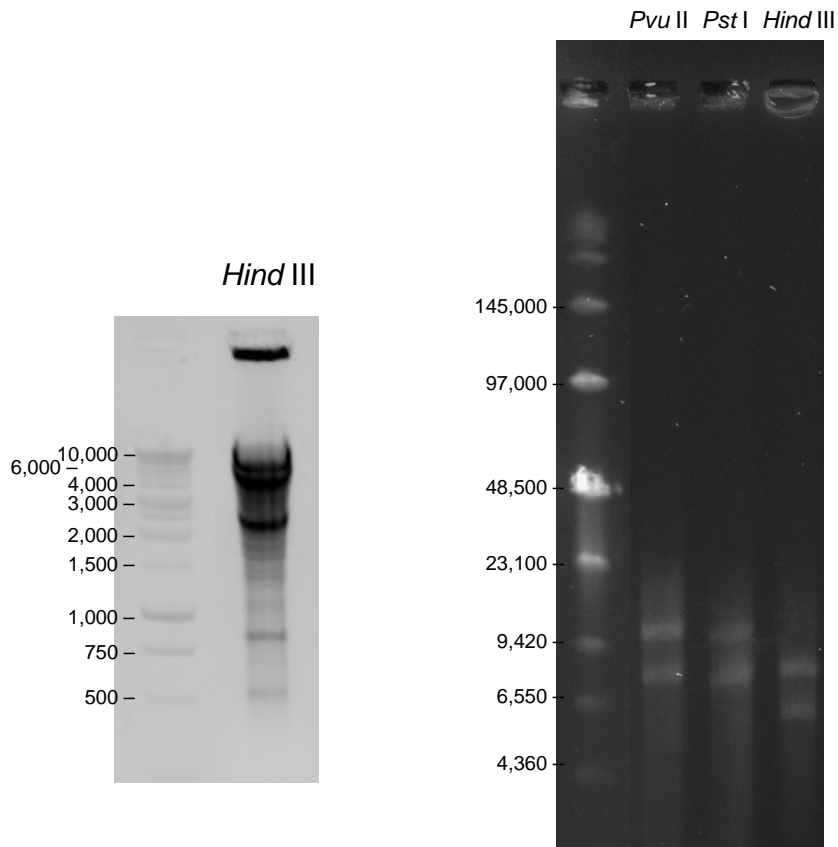


Figure 1: Size estimation of pVCR1 by normal agarose (A) or pulse field gel electrophoresis (B). pVCR1 was digested with *Hind* III, *Pvu* II or *Pst* I prior to electrophoresis as described in material and methods. Molecular weights of the 1kb ladder (Promega) and the Low ladder range PFG (Biolabs) are indicated (kb).

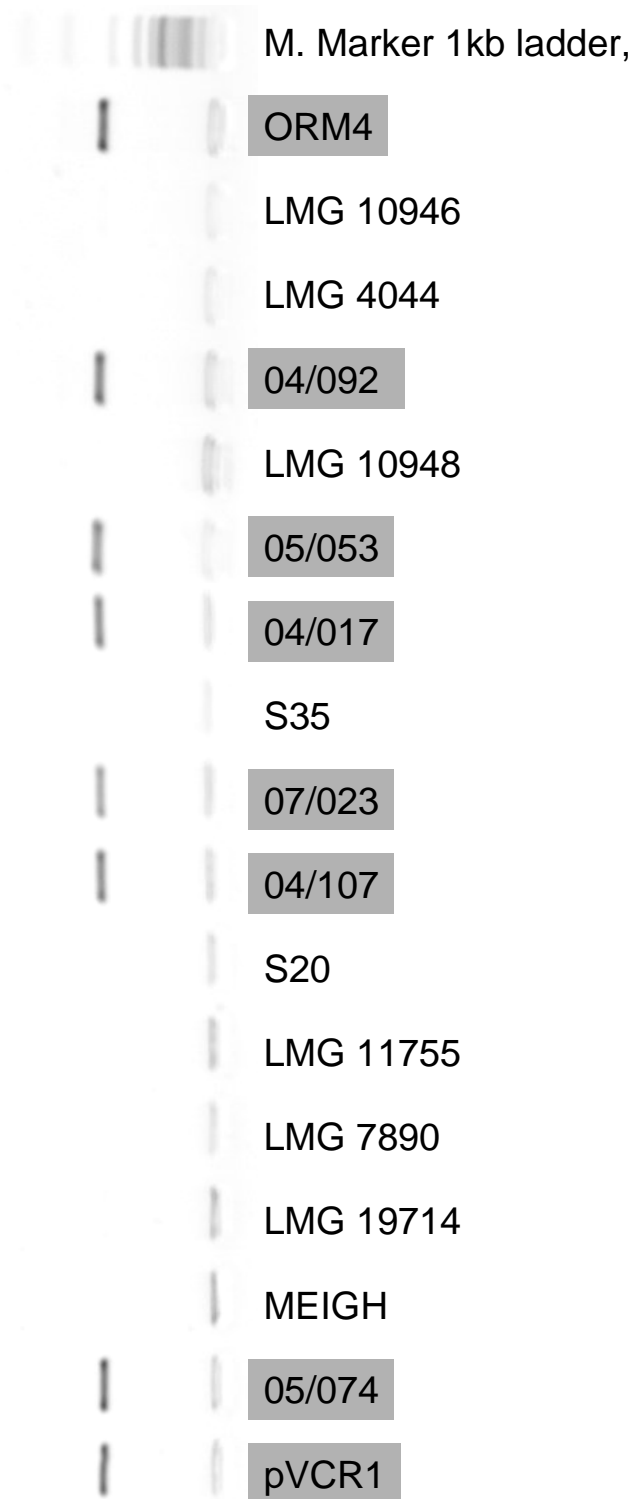
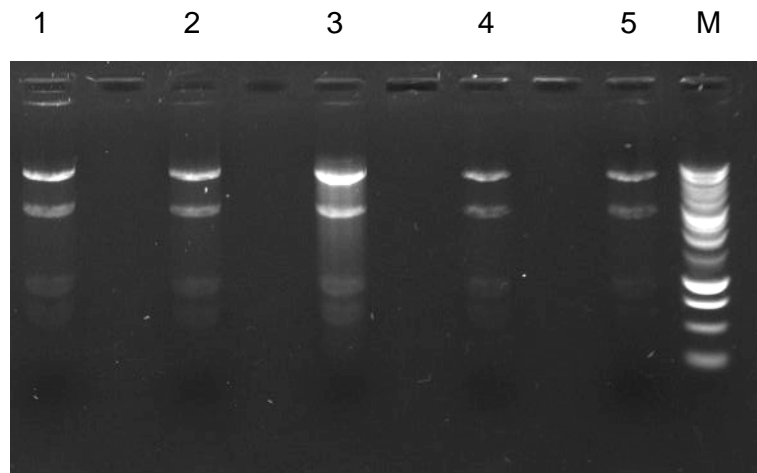
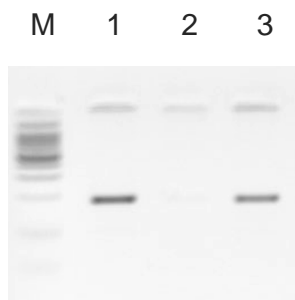


Figure 2: PCR amplification of pVCR1-like plasmids in different *V. harveyi* strains. Isolates from French moribund abalone are indicated in grey.



1. 04/107, 2. 04/092, 3. ORM4, 4. 05/058, 5. 05/074, M. Marker, 1kb ladder

Figure 3: *Hind* III restriction pattern of the plasmids isolated from the French moribund abalone isolates.



M. Marker 1kb ladder, 1. pVCR1, 2. LMG 7890,
3. LMG 7890 + pVCR1

Figure 4: PCR with pVCR1-specific primers to confirm pVCR1- transfer into LMG 7890.

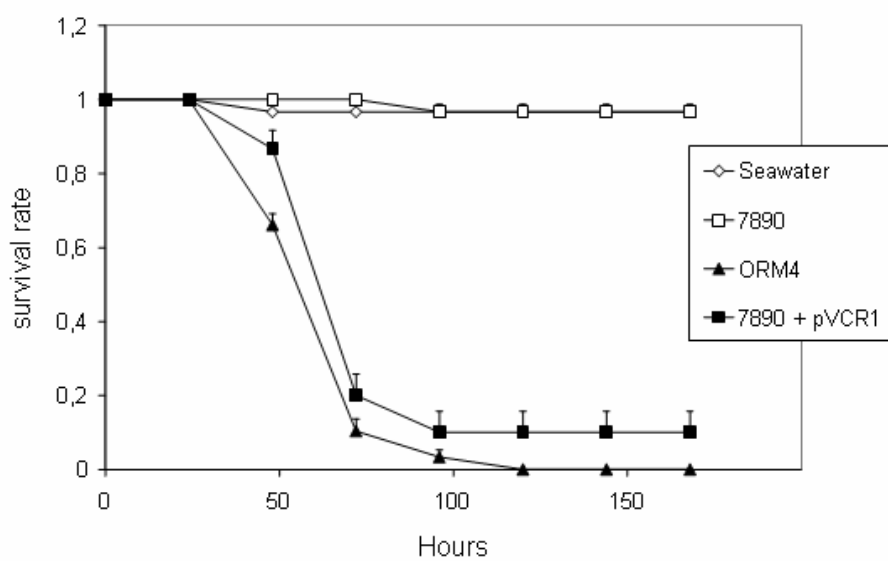


Figure 5: Abalone survival after intramuscular injection of the different *V. harveyi* strains (wild-type ORM4 and LMG 7890 or pVCR1 transformed LMG 7890) or sterile seawater.

CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'étudier l'interaction vibrio-ormeau en intégrant différentes approches, allant de l'écologie à la biologie moléculaire en passant par la physiologie et la biologie cellulaire. Ces recherches nous ont conduit à identifier des facteurs physiologiques et environnementaux favorisant le développement de la vibriose, et à entamer des travaux sur les bases moléculaires de la virulence bactérienne.

De par le peu d'études réalisées sur cette interaction, et afin de déterminer les conditions optimales au développement de cette vibriose, nous avons tout d'abord réalisé des suivis de l'interaction, en faisant varier, le plus finement possible, les paramètres un à un, et ce toujours dans le souci de rester dans des conditions les plus proches des conditions physiologiques, et d'aboutir à un modèle d'interaction bien défini. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux bases moléculaires de la virulence bactérienne, et à son support génétique, le plasmide pVCR1.

Ce travail de thèse nous conduit à présenter de nombreuses perspectives pour étendre encore la compréhension des mécanismes infectieux, qui, modulés par l'environnement et la physiologie des ormeaux, mènent à leur mort.

1. UN NOUVEAU MODELE D'INTERACTION GASTEROPODE MARIN - VIBRIO, MODULE PAR L'ENVIRONNEMENT

La compréhension des facteurs physiologiques et environnementaux définissant l'apparition d'une maladie est indispensable à la compréhension de celle-ci, et à sa potentielle prévention. Ainsi, une grande partie de ce travail a été axée sur l'étude fine des conditions nécessaires au développement de la vibriose de l'ormeau européen. Ces études ont permis la standardisation de nos protocoles expérimentaux et nous amène ici à proposer cette maladie comme un modèle de référence d'interaction gastéropode marin – *Vibrio*, modulé par l'environnement.

1.1 Importance de la température et de l'état de reproduction des animaux

L'importance de la température (15°C vs 20°C) avait été préalablement démontrée par Nicolas *et al.* (2002). De plus, une seconde étude corrélant les moyennes de températures de l'eau de mer, avec les différents épisodes de mortalités liés à *V. harveyi* depuis 1997, avait suggéré une température seuil autour de 16,5°C (Huchette et Clavier, 2004).

Dans le cadre de cette thèse, les différents facteurs susceptibles d'influencer l'apparition de la maladie ont donc été étudiés le plus finement possible, en laboratoire, mais aussi sur le terrain. Ces approches couplant des études écologiques et physiologiques ont permis de démontrer que la vibriose se développe uniquement quand la souche pathogène de *V. harveyi* est présente, conjointement avec une température de l'eau élevée (>17°C), et ce, au moment de la ponte des animaux (Figure 35).



Figure 35 : Représentations des 3 conditions nécessaires au développement de la maladie :

Un hôte sensible (période de reproduction), la présence d'un pathogène virulent (ce qui se traduit par la présence du plasmide pVCR1) et un environnement favorable (température >17°C).

A partir de ce schéma général de la maladie, différentes étapes du processus infectieux permettant la réussite de l'infection par le pathogène peuvent être proposées (colonisation initiale, passage de la barrière épithéliale, infection de l'hémolymphe et septicémie fatale) (Figure 37A). A sein du système « environnement - hôte - pathogène » la modulation d'un des partenaires aboutit à un échec infectieux. Des hypothèses vont maintenant être émises quant à l'évolution du processus infectieux dans chacun de ces cas (Figure 36 B-C et Figure 38 p214).

La température, tout d'abord, est apparue comme un facteur clé de déclenchement des mortalités : des températures inférieures ou égales à 17°C n'ont pas permis d'observer le développement de la maladie suite à des baignades en laboratoire, alors que des températures de 18°C conduisaient à 80% de mortalités en 7 à 15 jours (Article 1). Dans le milieu naturel, ce même seuil a pu être relevé, et il semblerait que des températures supérieures à 17,5°C au moment de la ponte des animaux, soient nécessaires pour observer des mortalités.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce seuil de température (Figure 36B). La température (17°C vs 18°C) agit tout d'abord sur la **croissance du pathogène**, pour qui l'optimum de croissance est décrit entre 28°C (Thompson *et al.* 2004) et 32°C (données non publiées), et qui pourrait être proche, à 17°C, de sa limite thermique. Cependant, des études préliminaires (réalisées uniquement en milieu riche) laissent penser que la croissance bactérienne n'est pas sensiblement influencée par les faibles variations de température affectant la vibriose de l'ormeau (17°C vs 18°C) (cf. p 170). Cependant, les temps de génération bactériens obtenus à 18°C en milieu riche (LBS) sont 3 x plus longs que ceux obtenus dans les contacts *in vitro* réalisés à 18°C (Article 5). Il est donc intéressant de se demander comment *V. harveyi* peut augmenter son taux de génération de 3 heures (en LBS) à 1 heure à 18°C quand il se trouve en présence d'hémocytes et du sérum

La température est également connue pour réguler certains **facteurs de virulence** chez les vibrions (Colquhoun & Sorum 2001; Larsen *et al.* 2004; Rosenberg & Falkovitz 2004), et nous pouvons envisager la régulation de facteurs impliqués dans la colonisation, la pénétration bactérienne, dans la multiplication au sein de l'hôte comme dans la toxinogénèse de la bactérie (Figure 36B). L'étude de l'impact de la température sur la croissance de la bactérie en eau de mer (complémentée en matières organiques ou en algues), et sur sa croissance dans les fluides de l'animal, ainsi que sur l'expression de facteurs de virulence doit être envisagée. Certains facteurs de virulence de *V. harveyi* étant connus, comme ses produits extracellulaires (protéases) par exemple, l'étude de leur production et de la toxicité qu'ils engendrent pourra être étudiée (Liu & Lee 1999; Montero & Austin 1999). Ces études pourraient être réalisées en utilisant des cellules sensibles à ces facteurs de virulence, comme les artémia (Defoirdt *et al.* 2006).

Des études plus globales telles que l'électrophorèse 2D, permettraient la comparaison des protéines exprimées à 17°C et à 18°C, suite à des cultures ou incubations en milieu riche ou en milieu minimum.

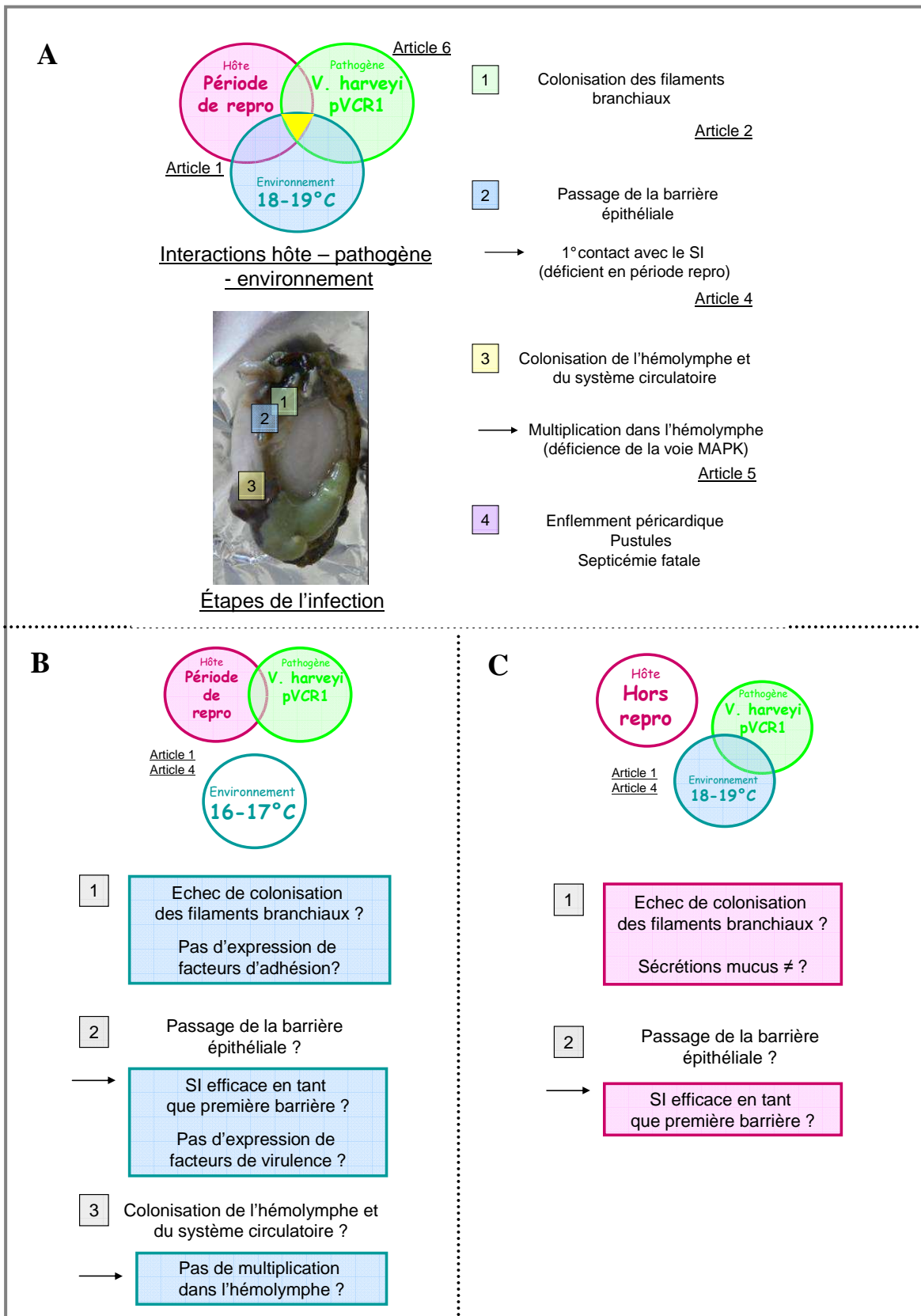


Figure 36 : Représentation des interactions hôte – pathogène – environnement, et des potentielles étapes de l'infection.

Hypothèses de l'évolution du processus infectieux sous différentes conditions quand (A) les 3 conditions nécessaires à l'infection sont réunies (B) les températures sont inférieures à 17°C, (C) l'hôte est hors de sa période de reproduction (Hors repro). SI Système Immunitaire.

Enfin, la température (17°C vs 18°C) pourrait également influencer l'hôte en jouant sur son **immunité** par exemple ([Figure 36B](#)), mais ceci reste peu probable, la température de 18°C étant décrite comme l'optimum thermique d'*H. tuberculata* (McBride *et al.* 2001). Il faut ajouter que des expériences préliminaires menées sur des hémocytes (ormeaux non conditionnés) placés à différentes températures (16 et 18°C) n'ont pas permis de mettre en évidence de variations significatives de différentes activités hémocytaires comme la phagocytose, la production d'espèces oxygénées réactives ou l'adhérence des cellules (données non publiées). Ces expériences demandent bien sûr à être confirmées par des expériences similaires, mais en conditionnant les animaux à différentes températures, et pour différents degrés de maturation, et non plus seulement les cellules.

La température joue un rôle fondamental sur le développement des gonades chez l'ormeau. Ainsi, la **date de ponte** des animaux peut être calculée en additionnant les températures journalières au dessus de 7°C : les animaux émettent leurs gamètes après 1450 degrés-jours, même si des pics brutaux de température peuvent également mener à des pontes partielles. **Température et reproduction** sont donc intimement liées dans le milieu naturel, et outre l'importance de la température, et de la présence d'une souche pathogène de *V. harveyi*, l'état physiologique des animaux est une donnée à prendre en considération. En effet, l'état de reproduction des ormeaux est un paramètre capital, puisque des animaux non-matures ne sont pas sensibles à cette maladie, même si ils sont en contact avec *V. harveyi* à des températures de 19°C ([Article 1](#)). La fenêtre de susceptibilité des ormeaux se situe autour de leur période de ponte, et leur sensibilité est maximale juste après la ponte totale ([Article 4](#)). L'importance de la ponte sur la sensibilité des mollusques à différentes maladies a déjà été rapportée chez l'huître (Samain & McCombie 2007), et a pu être associée à un déficit énergétique ou immunitaire pendant cette période (Soletchnik *et al.* 1997; Li *et al.* 2007). Mais dans le cas de l'interaction *V. harveyi* – *H. tuberculata*, la ponte des animaux paraît influencer uniquement les deux premières phases du cycle infectieux, c'est à dire la colonisation et la pénétration du pathogène ([Figure 36C](#)). En effet, les expériences de balnéation sont bien dépendantes de l'état de maturation des animaux, mais les expériences d'injections intramusculaires induisent l'apparition de 100% de mortalités quelle que soit la dose injectée (jusqu'à 10 bactéries / animal), quelle que soit la température et quel que soit l'état de maturité des ormeaux (données non publiées). La physiologie de l'animal, en particulier son bilan énergétique et son immuno-compétence joueraient un rôle primordial pour limiter la réussite des premières étapes de l'infection ; une fois le pathogène entré, celui-

ci par contre serait capable de façon particulièrement efficace de coloniser son hôte, de se multiplier très rapidement et d'entraîner sa mort. Enfin, l'hypothèse d'une modification des sécrétions de mucus (selon l'état de reproduction des animaux) qui influencerait les premières étapes infectieuses peut être émise.

La validation de ces hypothèses par le suivi, chez des animaux présentant différents niveaux de maturité, et à différentes températures, de la potentielle colonisation des tissus semble indispensable.

De plus, de part la mise en évidence récente de deux sous-espèces d'*H. tuberculata* coexistants dans des zones infectées (Annexe 1), leur comparaison physiologie / investissement dans la reproduction / immunité / sensibilité à *V. harveyi* pourrait permettre d'expliquer les différences de taux de mortalités relevées le long du littoral normand.

Enfin, nous avons récemment mené une étude, non présentée ici, qui a permis d'observer une certaine résistance des ormeaux suite à deux infections successives (80% de mortalités en moyenne après une première infection et 50-60% de mortalités en moyenne après une deuxième infection, significativement différent). Ces « résistance » des animaux à une deuxième infection peut avoir une origine génétique, ou être expliquée par l'existence d'une mémoire immunitaire chez les ormeaux. Ces résultats encourageants quant à la capacité de résistance à la vibriose de certains individus nous a conduit à participer à une étude comparative des ARN messagers différentiellement exprimés chez les individus sensibles ou non. L'analyse préliminaire des données a permis de suggérer un déficit de certaines fonctions physiologiques comme le métabolisme général et l'activité musculaire chez les individus sensibles (Marion Cardinaud, 2008, rapport de Master 2).

Ces études demandent à être complétées, et validées sur des familles présentant des niveaux de sensibilité différents, ou sur une même famille mais en faisant varier les paramètres physiologiques et environnementaux (température et reproduction par exemple) susceptibles d'influencer les stades de développement de la maladie (cinétique de l'infection et étapes de colonisation des tissus).

1.2 La vibriose de l'ormeau européen, un modèle de référence pour l'étude du système « environnement – hôte – pathogène » ?

L'impact des facteurs environnementaux sur l'expression des maladies, et en particulier l'impact du réchauffement climatique sur les écosystèmes marins est une thématique en plein essor (Harvell *et al.* 2002; Ben-Haim *et al.* 2003). En effet, la connaissance de l'impact du réchauffement sur des espèces marines incapables de réguler leur température et donc directement sujettes aux variations de l'environnement, est particulièrement importante pour la gestion des stocks, et la future préservation des espèces.

Un exemple de mauvaise gestion des stocks, liée à des modèles de pêche basés sur l'hypothèse d'un environnement stable, nous vient des Etats-Unis. L'ormeau blanc californien, *Haliotis sorenseni*, a subi ces dernières années, de fortes pressions, (i) épidémiques, liées au « Withering Syndrome », et (ii) écologiques, le réchauffement climatique ayant perturbé la composition algale de leurs habitats et (iii) également des pressions liées à une pêche mal régulée (Vilchis *et al.* 2005). Ces pressions ont conduit à une sévère chute des stocks et ont mené les autorités compétentes à considérer, en 2002, *H. sorenseni* comme une espèce en voie de disparition (Hobday *et al.* 2001).

La prise en compte dans la gestion des stocks d'espèces subissant de fortes pressions de pêches, de l'impact des facteurs environnementaux sur les écosystèmes marins, et sur les interactions hôte – pathogène paraît indispensable. Pour cela, des modèles d'interaction hôte - pathogène fiables, expérimentalement « simples », finement décrits, et clairement modulés par l'environnement, sont nécessaires. Des modèles de vibrioses ont déjà été finement décrits chez les bivalves comme les palourdes et les huîtres (Paillard *et al.* 2004b) et des modèles numériques environnement – hôte – pathogène ont été également développés récemment dans le cas de la maladie de l'anneau brun (Flye-Sainte-Marie 2007).

Le modèle de vibriose chez le gastéropode marin qui est présenté ici comporte quelques particularités et plusieurs avantages:

- une **espèce hôte**, *H. tuberculata*, largement installée sur les côtes européenne (deux sous-espèces vivant en sympatrie dans la zone côtière). L'ormeau est cultivé, et peut être conditionné en éclosérie afin de permettre des pontes à plusieurs périodes de l'année. L'état

de développement gonadique influence particulièrement la sensibilité des ormeaux au pathogène ;

- un **agent pathogène**, *V. harveyi*, opportuniste, largement dispersé dans les écosystèmes marins, et porteur d'un plasmide associé à la pathogénicité. Ce plasmide offre la possibilité de détection des souches pathogènes ;
- des **facteurs environnementaux et physiologiques** clés : température et état de reproduction.

Les points forts de ce modèle d'interaction résident dans :

- des protocoles de contamination simples, physiologiques (baignation), reproductibles, et des expériences courtes (une à deux semaines) ;
- un seuil thermique : 1°C conditionne le développement de la maladie ;
- une fenêtre de sensibilité de l'hôte déterminée : la période de développement gonadique et de post-ponte ;
- une bactérie cultivable, transformable GFP et hautement virulente : 1 seule bactérie injectée suffit à tuer 100 % des animaux en une semaine ;
- des souches de *V. harveyi* virulentes et non virulentes pour l'ormeau européen, ainsi que des souches virulentes pour l'ormeau japonais.

La connaissance et l'utilisation de ce modèle nous a permis d'aborder la question de l'impact du réchauffement climatique sur l'apparition et le développement de cette vibriose.

1.3 Réchauffement climatique : une maladie émergente ?

Sur les 15 dernières années, **un réchauffement de 1°C** a été constaté dans les eaux côtières de Normandie et de Bretagne (Esnault & Barraer 2005) ([Article 1](#)). Ce phénomène a conduit à des températures supérieures à 17°C sur les côtes normandes durant le mois de septembre et à l'observation de pontes apparaissant plus tôt dans l'année, au moment où les températures sont les plus élevées. Ce réchauffement climatique a été proposé comme étant un facteur déterminant dans l'apparition des mortalités en Bretagne Nord et en Normandie ([Article 1](#)). Cependant, ceci est à nuancer par le fait que des mortalités ont déjà été signalées depuis 1997 en Bretagne Sud, zone où les températures de l'eau sont depuis toujours supérieures à 18°C au mois de septembre. Le réchauffement pourrait ainsi participer à

l'étendue des zones touchées par cette pathologie, mais n'est qu'un des facteurs favorisant son développement. La question de l'origine de l'apparition de cette vibriose en France, et de la potentielle introduction du pathogène reste entière.

Concernant **l'apparition de cette vibriose**, plusieurs scénarios sont à retenir. Soit le pathogène était préalablement présent en France et son évolution (comme par exemple par l'acquisition d'un plasmide porteur de facteurs de pathogénicité) a mené aux premières mortalités. L'apparition de ces mortalités ne semblant répondre aux lois de la courantologie (Basuyaux, communication personnelle), il est alors envisageable que sa dissémination en France soit liée aux transferts d'animaux porteurs (crevette ? poissons ?), ou aux eaux de ballastes des bateaux.

Le deuxième scénario envisageable découle de l'observation de mortalités d'ormeaux liées à *V. harveyi* au Japon dès 1980. Le transit d'ormeaux, *H. discus hannai* en provenance du Japon dans les années 1996-1997 en France, prendrait alors une toute autre signification. Deux sites auraient abrités des ormeaux japonais : chacun de ces sites a été touché, l'année suivante, par de fortes mortalités d'*H. tuberculata*. La comparaison des souches françaises et japonaises de *V. harveyi* pathogène d'ormeau devrait permettre de confirmer ou d'infirmer ce deuxième scénario. Cette comparaison a déjà été entamée, et les souches japonaises du Dr Sawabe ne semblent pas capables d'induire de mortalités par baignade sur l'ormeau européen (résultats non publiés), et ne portent pas le plasmide pVCR1. Mais l'absence de témoin positif (ormeaux japonais) ne nous permet pas de conclure formellement à l'absence de pathogénicité de cette souche envers l'ormeau européen. D'autres souches sont à tester (virulence et présence de plasmide) sur une plus grande diversité d'ormeaux.

2. CYCLE INFECTIEUX, LOCALISATION BACTERIENNE

Les trois seules études traitant de l'interaction *V. harveyi* – ormeau décrivent l'hémolymphe comme compartiment cible de la bactérie, et une potentielle localisation de celle-ci au niveau du muscle (Sawabe *et al.*, 2007, Nicolas *et al.*, 2002, Nishimori *et al.*, 1998) et des branchies (Sawabe *et al.*, 2007). Mais les cycles infectieux au sein de l'hôte et au sein de son environnement n'avaient jamais été étudiés. Ces données pourraient cependant s'avérer indispensables pour permettre de détecter précocement la maladie dans les élevages d'ormeaux.

Notre travail a permis de mieux comprendre la dynamique d'une infection liée à *V. harveyi*. Tout d'abord, il est intéressant de noter que les différentes infections par balnéation que nous avons réalisées pendant ces 3 années (sur des animaux de même taille et dans des conditions expérimentales optimales) ont systématiquement mené à l'observation de 50 à 80% de mortalité en une semaine. Le suivi de la présence du pathogène (*V. harveyi*-GFP quantifiée en cytométrie en flux) dans l'eau de mer et dans les tissus et fluides des animaux moribonds nous a amené à proposer un schéma infectieux ([Article 2](#)). Celui-ci serait composé d'une phase de colonisation, d'une phase de pénétration du pathogène dans son hôte, d'une phase d'incubation de la maladie (multiplication du pathogène), puis d'une phase de mortalités aiguës ([Figure 37](#)).

Les **phases de colonisation et de pénétration** dans l'hôte ont été « fixées » dans nos expériences puisque nous procédions à une balnéation à hauteur de 10^5 bactéries/ml pendant 24 heures avant de changer entièrement l'eau des bacs. A la fin de cette phase, les bactéries n'étaient plus détectées sous forme libre, indiquant une potentielle association de la bactérie sur un substrat (adhésion sur les épithéliums, ou sur tout autre substrat) et / ou pénétration au sein de l'hôte. A la fin de ces phases, les bactéries ont pénétré les tissus et des animaux prélevés au jour 2 ou 3 de l'infection présentaient des concentrations moyennes de 10^4 *V. harveyi* – GFP / 100 mg d'organes (Annaïck Barbou, 2008, rapport de Master 2).

Pendant une **phase d'incubation** de 2 jours environ, le pathogène semble capable de se multiplier au sein de son hôte ; il n'est plus détecté dans le milieu et aucune mortalité n'a été notée. De plus, à la fin de cette phase dite d'incubation, de fortes mortalités associées à des pics de concentrations en *V. harveyi* ont pu être relevées chaque jour, malgré le changement journalier total de l'eau des bacs. Il est intéressant de savoir que le cycle infectieux peut être reproduit pour des doses de bactéries allant jusqu'à 10^3 bactéries / ml, les petites doses amenant à une phase d'incubation plus longue, mais au mêmes taux de mortalités.

L'observation d'une corrélation entre un pic de *V. harveyi* sous forme libre et l'apparition des mortalités nous a amené à formuler l'hypothèse d'un **relargage massif des bactéries** à partir de l'hémolymphe des animaux. Sachant que (i) les animaux utilisés dans cette expérience devaient avoir au minimum 1 ml d'hémolymphe, que (ii) l'hémolymphe des ormeaux moribonds peut contenir 10^9 bactéries/ml, et que (iii) les individus morts n'ont « plus » d'hémolymphe, l'hypothèse d'un relargage des bactéries par diffusion ou éjection de l'hémolymphe dans les 30 L d'eau de mer mènerait effectivement aux concentrations relevées aux jours 4, 5 et 7, de l'ordre de $5.10^4 - 10^5$ bactéries libres/ml.

Mais ce **schéma infectieux** demande à être complété. La dynamique de colonisation des tissus menant à la septicémie fatale aux animaux pourrait être étudiée en quantifiant *V. harveyi* dans les tissus d'ormeaux prélevés quotidiennement par cytométrie en flux, ou par des analyses microbiologiques (sur milieux de culture). De plus, aucune lésion tissulaire marquante n'a pu être observée sur des coupes histologiques, même si des bactéries ont pu être observées associées aux cellules ciliées branchiales, dans le muscle, au niveau des sinus lymphatiques et dans l'hémolymphe. Il serait intéressant de pousser ces études afin d'identifier la voie d'entrée du pathogène, ce qui pourrait amener à sa détection précoce. Il est également possible d'imaginer la définition de stades de maladie, basés par exemple sur l'atteinte de tel ou tel organe. L'hémolymphe étant apparue comme le dernier organe colonisé, la classification des individus pourrait éventuellement se faire en fonction des concentrations en *V. harveyi* dans ce fluide.

Enfin, l'étude du cycle infectieux dans des microcosmes complexifiés, avec des algues, des sédiments, des rochers, par exemple, permettrait d'identifier les différentes associations de la bactérie dans le milieu, et peut-être les réservoirs de celle-ci.

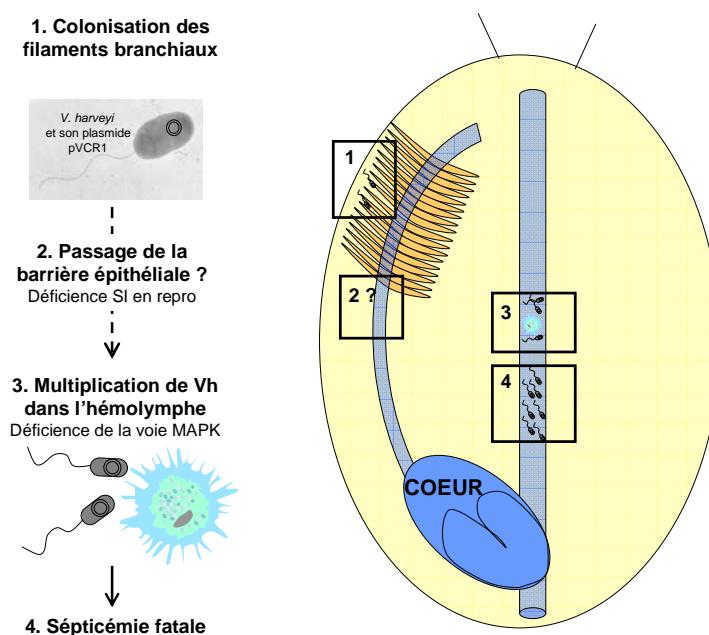


Figure 37: Représentation schématique hypothétique des étapes infectieuses qui mènent à la mort des ormeaux.

Après la colonisation des filaments branchiaux, *V. harveyi* (Vh) passerait la barrière épithéliale, avant de rejoindre l'hémolymphe, où elle se multiplierait pour entraîner la septicémie fatale à l'ormeau. Branchies (en orange), système circulatoire (en bleu) et muscle (en jaune) sont schématisés. SI = système immunitaire.

3. IMMUNITÉ DE L'ORMEAU ET INTERACTIONS *IN VITRO*

Dans le cas de la vibriose de l'ormeau, le pathogène a été systématiquement isolé comme « culture pure » dans l'hémolymphe (Nicolas *et al.*, 2002, Article 1). Or, aucune description du système immunitaire de l'ormeau *H. tuberculata* n'avait été réalisée. Ce travail de thèse a donc débuté par la caractérisation des cellules immunitaires et de leur fonctionnalité. Cette description nous a amené à identifier deux types principaux de cellules circulantes, les hyalinocytes et des cellules peu différenciées, les blastes. La quasi-absence de granulocytes chez cette espèce, en comparaison avec ce qui est décrit chez les bivalves, nous amène à proposer une nouvelle classification des cellules chez les gastéropodes, s'appuyant potentiellement sur la quantité de glycogène contenue, plutôt que sur la présence de granules acides ou basiques.

Ces cellules ont pu être triées en cytométrie en flux, ce qui a permis leur caractérisation histochimique (Travers *et al.* 2008, article 3). Cette possibilité de tri permet également d'envisager des études plus poussées sur la différenciation des blastes, qui est jusqu'à lors très peu connue.

Les hyalinocytes d'ormeau présentent de grandes quantités de glycogène. Les hémocytes de mollusques étant impliqués dans des fonctions très diverses comme le stockage de nutriments et leur transport, nous pourrions également envisager d'utiliser cette propriété pour mesurer l'implication des cellules immunitaires dans la reproduction, qui nécessite beaucoup d'énergie et la mobilisation des ressources. L'immunité de l'animal semble impliquée dans sa sensibilité à *V. harveyi* pendant sa période de reproduction. Ainsi, il serait important de quantifier les quantités de glycogène stockées dans les cellules immunitaires au cours du cycle de reproduction et de tenter de faire des liens avec la déficience immunitaire en fin d'été et automne. Il est ainsi envisageable de ne plus mesurer que les « capacités immunitaires » des hémocytes, mais un ensemble de capacités qui reflèteraient plus leur disponibilité et leur efficacité. La mise au point de tests permettant de quantifier leur implication dans les différents processus serait alors indispensable.

Les **contacts cellulaires hémocytes – bactéries** nous ont permis de mettre en évidence une déficience des hémocytes en présence des souches pathogènes de *V. harveyi*. En effet, ces dernières sont capables de pousser dans l'hémolymphe (à la différence des souches non pathogènes) malgré la présence des hémocytes, sans pour autant que nous ayons décelé

de toxicité directe envers les hémocytes. Ces observations nous ont amené à envisager la déficience des hémocytes comme une conséquence de l'inhibition par la bactérie de leurs capacités de défense ou de la non reconnaissance du pathogène, c'est-à-dire d'un échappement bactérien. Nous avons ainsi choisi d'étudier l'induction précoce de la réponse immunitaire des hémocytes à travers une protéine-kinase impliquée dans une voie de signalisation utilisée dans la reconnaissance des bactéries à Gram négatives chez les mollusques, la MAP Kinase p38. Cet acteur, activé quand il est phosphorylé, est à la base de l'induction de la phagocytose et de la production d'espèces oxygénées réactives (EORs). Nous avons pu observer un retard dans la phosphorylation de la MAP Kinase p38, ainsi qu'une induction plus faible et plus courte, en réponse à la souche virulente de *V. harveyi*, comparativement à la réponse induite par les isolats non virulents. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la protéine p38 a permis d'observer la croissance des isolats non virulents dans l'hémolymphe, et l'absence de production d'EOR dans les hémocytes, traduisant une réponse hémocytaire proche de celle observée en présence de la souche virulente ([Article 5](#)).

Ces expériences nous ont permis de proposer l'inhibition partielle de la voie p38 comme stratégie de virulence de la souche ORM4 pathogène pour l'ormeau. Le ciblage spécifique de cette voie par *V. harveyi* reste à confirmer, en étudiant par exemple l'induction des autres voies de MAPK (JNK et ERK) ou de la voie NFκB, et l'effet de leurs inhibitions respectives sur la réponse envers les souches non pathogènes. Enfin, afin de savoir si *V. harveyi* inhibe globalement les hémocytes (stratégie d'inhibition globale) ou s'il inhibe spécifiquement la réponse immunitaire dirigée contre lui, en se camouflant par exemple (stratégie d'échappement), des expériences de co-infections *in vitro*, mettant en contact les hémocytes avec différentes souches de *V. harveyi*, et des levures ou des billes (qui permettraient de quantifier les taux de phagocytose), sont à envisager.

Enfin, des systèmes de sécrétion de type III étant connu chez *V. harveyi*, ils pourraient également être recherchés dans la souche pathogène de l'ormeau. Leur importance dans l'inhibition des hémocytes, via le transport de molécules modifiant potentiellement les récepteurs membranaires liés à la reconnaissance ou des protéines perturbant la phagocytose, pourrait être étudiée suite à la conception de mutants déficients pour ces protéines.

4. VIRULENCE DE *V. HARVEYI* ET PLASMIDE

Un résultat fort de notre étude réside dans l'isolement d'un **plasmide de 18 kb** dans les souches de *V. harveyi* virulentes pour l'ormeau et son absence dans les souches non virulentes. Le séquençage de fragments de ce plasmide a d'ores et déjà permis de développer un test PCR permettant de confirmer la présence spécifique de ce plasmide dans toutes les souches virulentes pour l'ormeau européen isolées. Ce plasmide a pu être impliqué dans la virulence des souches de *V. harveyi* : la transformation de souches non virulentes de *V. harveyi* par électroporation avec le plasmide pVCR1 a permis d'induire après injection dans les tissus une virulence comparable à la souche sauvage ORM4. Ainsi, ce plasmide semble à lui seul porter les éléments nécessaires à induire une septicémie et la mortalité des ormeaux. Par contre, l'importance de ce plasmide dans la colonisation et la pénétration au sein des tissus n'est toujours pas connue. L'obtention de la séquence complète du plasmide, la construction de souches contenant des plasmides mutants et des expériences de balnéation avec ces souches permettraient de confirmer le rôle essentiel de ce plasmide dans les premières phases de développement de la vibriose. Des hypothèses peuvent être émises quant aux raisons de l'échec infectieux des souches de *V. harveyi* sans plasmide (Figure 38). Elles pourront être plus précisément étudiées suite à la réalisation d'expériences de curage, qui permettraient de disposer de souches isolées d'ormeau européen, mais sans plasmide.

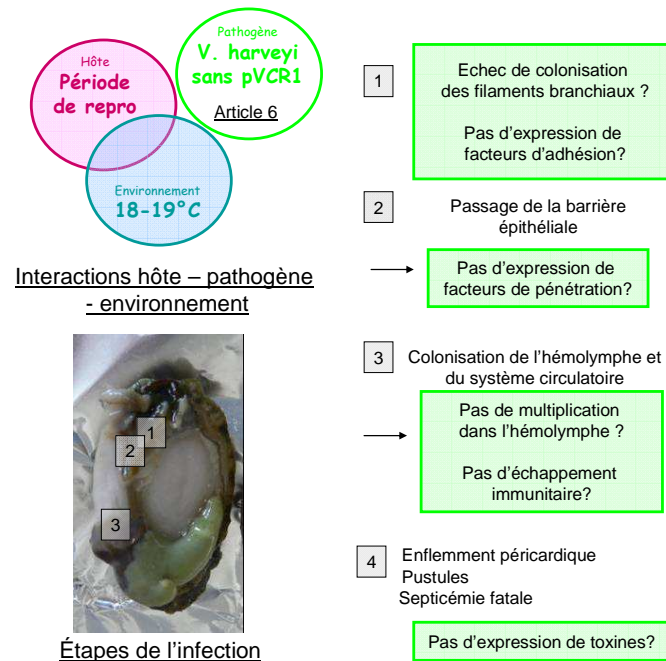


Figure 38 : Représentation des interactions hôte – pathogène – environnement, et hypothèses sur l'échec infectieux de *V. harveyi* quand celui-ci est sans plasmide (*V. harveyi* sans pVCR1).

Les premières séquences obtenues laissent présager que ce plasmide serait conjugatif. Des expériences de conjugaison devront donc être menées afin de confirmer la fonctionnalité de ces séquences et la potentialité de transferts horizontaux. De plus, des expériences de transfert de pVCR1 dans des souches plus éloignées de *V. harveyi* devraient permettre d'évaluer l'importance de ce plasmide dans la pathogénicité. Enfin, la recherche de ce plasmide dans de nouveaux isolats de *V. harveyi* venant d'Australie ou du Japon est à envisager.

Suite au séquençage complet du plasmide pVCR1, l'analyse des banques protéiques et génomiques, permettra son annotation et donc l'identification des éventuels facteurs impliqués dans la virulence. Une étape de validation de l'implication de ces facteurs pourra être réalisée par des approches d'inactivation de gènes et leur caractérisation pourra être menée par des approches biochimiques et fonctionnelles. Parallèlement, des expériences d'électrophorèse 2D-DIGE permettraient de comparer le protéome des souches non virulentes et des souches non virulentes transformées par pVCR1, et ainsi d'identifier les protéines exprimées par ce plasmide et induites ou réprimées dans l'hôte.

5. CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces 3 années nous ont permis de profondément avancer dans la compréhension d'une maladie jusque là très peu étudiée, la vibriose de l'ormeau européen. Nous avons pu standardiser des protocoles, en étudiant finement les différents facteurs physiologiques et environnementaux influençant le développement de la maladie. Ceci nous a amené à définir cette interaction comme un modèle infectieux permettant l'étude de l'impact du réchauffement climatique sur les interactions mollusque marin – *Vibrio*, et à proposer l'extension de cette maladie en Europe du Nord comme une conséquence du réchauffement climatique. Nous avons également pu commencer la description du système immunitaire de ce mollusque marin, et étudier son importance, lors d'un cycle de reproduction, dans le développement de cette vibriose. Et enfin, les bases génétiques et mécanistiques de la virulence bactérienne ont pu être abordées et ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de cette interaction.

Le fruit de ces recherches permettra à « l'halioticulture » naissante en Europe d'envisager un avenir plus serein, de part la connaissance et la maîtrise du risque pathologique.

ANNEXE



Coexistence of two subspecies of the abalone *Haliotis tuberculata* (Mollusca: Gastropoda) along the European coasts: phylogeographic study revealed by mitochondrial marker COI

Journal:	<i>Marine Biotechnology</i>
Manuscript ID:	MBT-08-0108
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Jun-2008
Complete List of Authors:	Le Bras, Yvan Courtois, Gercende Travers, Marie-Agnès Huchette, Sylvain van Wormhoudt, Alain; Station de Biologie Marine; Station de Biologie Marine
Keywords:	<i>Haliotis tuberculata</i> , population , mtDNA, phylogeography, Europe, Atlantic

1 **Coexistence of two subspecies of the abalone *Haliotis tuberculata* (Mollusca:**
2 **Gastropoda) along the European coasts: phylogeographic study revealed by**
3 **mitochondrial marker COI.**

4
5 **Y Le Bras^a, G Courtois^b, M-A Travers^{c,d}, S Huchette^c, and A Van Wormhoudt^a**

6
7 **a UMR 5178, Station de Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle, 29900,**
8 **Concarneau, France.**

9
10 **b Grupo de Investigación en Acuicultura (ICCM&IUSA) P.O. Box 56 35200 Telde, Las Palmas,**
11 **Canary Islands, Spain.**

12
13 **c France Haliotis, Kerazan, 29880 Plouguerneau, France.**

14
15 **d UMR 6539, IUEM, 29280, Technopole Brest Iroise, France.**

16

Abstract

H. tuberculata populations were sampled at 19 sites along the Atlantic and Mediterranean coasts from Normandy to the Canary Islands. Sequence variation of the mitochondrial DNA COI was analysed. A total of 33 haplotypes were detected among 241 individuals with a total of 41 variable sites out of 531 bp sequenced. The mitochondrial haplotypes were grouped into two major distinct clades (estimated to differ by about 3.4 % nucleotide divergence) divided into the Canary haplotype (*H.t. coccinea*) and the others. Sixty percent of Canary haplotypes were found only in the Canary Islands. These haplotypes were present in most populations and reached 35% in Normandy while they were absent in some isolated areas. This is the first evidence of the presence of *H.t. coccinea* in North Europe. Other haplotypes differs at a maximum of 0.75 percent between them, indicating a recent divergence. The total genetic variance was strong within sites and weak for the overall, indicating a low level of intrapopulation variation.

The geographical distribution and structure of *H. tuberculata* population is described for the first time and evolutionary history of *H. tuberculata* subspecies is also discussed. This study provides basic informations for future European abalone genetic studies.

Correspondance should be adressed to Y Le Bras, present address INRA SCRIBE, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex

Introduction

Over the past decades, several abalone species declined throughout the world. Different factors may account for this decline, including over-fishing, habitats destruction, and epidemic diseases. Lack of species-specific knowledge about life history and population dynamic led to abalone decline in the US resulting in the proposal to include white abalone (*Haliotis sorenseni*) and black abalone (*H. cracherodii*) on the endangered species list (Hobday *et al.* 2001; Gruenthal 2008). To compensate the reduced fishery resources, the abalone aquaculture industry is developing and restoration efforts are increasing (Dixon *et al.* 2006). As aquaculture development may affect genetic diversity (Mgaya *et al.* 1995), and considering the importance of preserving the natural gene pool, effort on population structure and genetic is needed for future restoration and management of the European abalone stocks.

Abalone are broadcast spawning marine gastropods found in temperate and tropical ecological niches (Geiger, 2000), and larval development includes a free-swimming phase (lecithotrophic veliger larvae). Hatched larvae are carried by currents and disseminated for a period of 3 days up to about 20 days with the marine currents of the surrounding seas (Clavier and Richard, 1986, Courtois de Vicose *et al.*, 2007). Therefore the genetic structure of abalone largely depends on the dispersal ability of the larvae and their recruitment pattern. The commercially important abalone species *Haliotis tuberculata* (*H.t.*) can be found on rocky shores from Senegal to the English Channel (Huchette and Clavier, 2004). It was characterized by a common 18S dDNA structure (Giribet and Wheeler; 2002 and NCBI submitted). Three subspecies have been morphologically described: *H. t. tuberculata* (Linnaeus, 1758), *H. t. lamellosa* (Lamarck, 1822) and *H. t. coccinea* (Reeve, 1846), but these species are quite similar in external morphology. Up to now the only abalone reported in the Azores is *H. t. coccinea*, and on the French coasts, *H. t. tuberculata* (Geiger 2000). Recent mortalities in Europe attributed to pathogens as bacteria (vibrio (Nicolas *et al.* 2002) or rickettsia-like (Azevedo *et al.* 2006b; Balseiro *et al.* 2006)) or parasite (haplosporidium (Azevedo *et al.* 2006a) have reduced the fishing effort and led to fishery closure in Normandy in 2005.

64 *H. tuberculata* is known to reach a maximum shell length of about 14 cm in Normandy, 9 cm
65 in the Canary Islands and 7 cm in the Mediterranean Sea. The size may also vary according to food
66 availability and the natural range of sea temperatures, between 17 and 24°C for the Canary island
67 (Courtois de Vicose *et al.*, 2007) and 8 to 16°C for Brittany specimen (Huchette and Clavier, 2004).

68 Different genetic markers were used to describe genetic diversity and/or structure in Haliotidae:
69 allozyme (Del Rio Portilla 2001; Hamm and Burton 2000; Mgaya *et al.* 1995; Zuniga *et al.* 2000),
70 microsatellites (Selvamani *et al.* 2000; Elliott *et al.* 2000; Evans *et al.* 2000; Huang *et al.* 2000; Tang
71 *et al.* 2005), genomic genes as sperm lysin (Huang *et al.* 2000; Clark *et al.* 2007; Swanson *et al.* 2001;
72 Lee and Vacquier 1995) or mitochondrial (mt) genes as Cytochrome Oxidase I (Elliott *et al.* 2000;
73 Hamm and Burton 2000; Maynard *et al.* 2005; An *et al.* 2005).

74 COI markers are robust evolutionary markers for determining intraspecific and interspecific
75 relationship in many marine molluscs, including abalone. Mt genes revealed differences in wild
76 population geographically separated of *H. diversicolor supertexta* in Taiwan (Jiang *et al.* 1995); *H.*
77 *midae* in South Africa (Evans *et al.* 2004), and *H. rubra* in Australia (Conod *et al.* 2002). Mt genome
78 knowledge also allowed to segregate abalone species within a natural population in Thailand
79 (Klinbunga *et al.* 2003) and in Australia (Metz *et al.* 1998; Elliott *et al.* 2000).

80 This study carried out a survey of *H. tuberculata* populations from Normandy to the Canary
81 Islands. Sequences variation of the mitochondrial DNA COI defined different haplotypes grouped into
82 two major clades, corresponding to *H.t. tuberculata* and *H.t. coccinea*. Genetic variations within and
83 between populations are presented. Geographic distribution and structure are discussed.

84 **Materials and Methods**

85 **Sampling**

86
87
88 241 individuals distributed over 19 populations were sampled in areas of known distribution of
89 *H. tuberculata* between the English Channel and the Canary Islands (Fig 1).
90

1 90 Individuals were sampled by removing a mantle epipodite (approximately 100 mg) from the periphery
2
3 91 of the foot. Samples were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes filled with 70% ethanol and stored at
4
5 92 -20°C.
6

7 93

94 **Genetic Study**

95 DNA was extracted with the CTAB method (Doyle and Doyle, 1987). Polymerase chain
96 reaction (PCR) was performed on 0.1µg of the DNAs. Primers used (COIFWHT: 5' -
97 CTACTTCTCTCTCTCCGAGT-3 ' and COIHT: 5' - ACTTAGTGTAGGAATCTGGGT-3') are
98 specific of a conserved area of gene coding for COI (3 ' area) and annealed at 52°C. The reactions
99 proceeded according to GE Healthcare procedure (Ready to Go PCR). After electrophoresis, the bands
100 were directly extracted from Agarose gel and DNA was extracted using the Kit Wizard SV Gel System
101 (PROMEGA).

102 The sequence reaction was performed on extracted PCR products with the use of the
103 sequencing reagents BigDye (Applied). The initial phase of denaturation (2 min. with 96°C) was
104 followed by 40 cycles of 96°C for 30sec., 50 °C for 30 sec. and 60 °C for 4 minutes. The DNA
105 sequences were determined by an automated sequencer (ABI 310).

106

107 **Data analysis**

108 Genetic parameters of the population were revealed with the help of DNAsp 4.0 (Rozas *et al.*,
109 2003). Analysis of mtDNA variability and population differentiation within samples of *H. tuberculata*
110 were examined by computing firstly the nucleotide and haplotype diversity indices and secondly
111 haplotype frequencies and pairwise comparisons of the Fst values using analysis of molecular variance
112 in Arlequin v.3.1.(Excoffier *et al.*, 2005) based on 20 000 permutations of the data matrix. Average
113 pairwise differences among populations (Nei and Li, 1979) were obtained by the use of the same
114 software. Relationships among haplotypes are estimated using Network v.4.2 (Forster *et al.*, 2001).

115 DNA sequences were treated, aligned, edited and viewed using Mega 3.0 (Kumar *et al.*, 2004),
116 and Bioedit (Hall, T.A., 1999).

117

Results

The sequencing of a fragment of 531 base pairs length of the mitochondrial gene coding for the COI revealed the presence of 41 polymorphic sites (35 parsimonious sites is 85.36% and 6 singletons), thus making it possible to define 33 haplotypes, presented in table 1, which clustered in five major groups by the number and positions of their variable sites. The four first ones represent *H. t. tuberculata* and the fifth, *H. t. coccinea*. Nucleotidic sequences of haplotypes from each group (1, 22, 15, 20 and 31) were entered in NCBI in respective UE 488700 to UE488704 accession numbers. The translation of the nucleotidic sequences into amino acids indicates that the changes observed between the two subspecies are silencious for the studied DNA fragment.

Within the samples, a weak genetic structure was suggested by a strong haplotypic diversity at each station (Table 2). High levels of intrapopulation diversity were observed at all the samples sites, the lowest nucleotidic diversity (0.006) and haplotypic diversity (0.70-0.71) occurs in South Brittany population. Weak nucleotidic diversity per clade indicated that haplotypes were not fundamentally different from one another. High nucleotidic diversity suggested the presence of the two subspecies. The strongest rate of haplotypic diversity was found in Galicia and Normandy.

The data for the 33 haplotypes were aligned and their distribution within the populations presented in table 3. Haplotype 1 was dominant (10 to 100%) in all populations except for Crozon (n=3 only) and the Canary islands. There are three specific haplotypes which are reported only in one station. About 52% of the individuals were assigned to three haplotypes (1, 3, and 15) and 18% of the samples had the *H. t. coccinea* genetic signature (table 1). The average number of pairwise differences and pairwise Fst values between populations is shown in Table 4.

Pairwise genetic differences ranged from 1.15 (between Brignogan and Concarneau) to 10.77-17.4 (between Canary Islands and the others) and reveals equally that Concarneau station is relatively homogeneous and Bretteville less.

There is a difference between the population genetic structure in the Canary Islands and the other areas. Guernsey and Banyuls were also unique sample sites.

1 145 The Network presented in figure 2 shows the differences between the two subspecies as well as
2
3 146 the existence of four sub-groups in the *H. t. tuberculata* lineage. The AMOVA analysis within six
4
5 147 regions (ie, Normandy, North Brittany, South Brittany, Spain, Mediterranean Sea and Canary islands)
6
7 148 reveals a relative high F_{st} value (0.251), and showed that the majority of the total genetic variance
8
9
10 149 (74.91%, $p < 0.001$) occurred within populations, and to a lesser extent among regions (21.38%,
11
12 150 $p < 0.02$), with little among population within regions (3.71%, $p < 0.02$).

13
14 151 The haplotypes network confirms the population structure at large geographic scale and the
15
16
17 152 global phylogenetic tree cut in 5 distinct genetic groups as defined in table 1. To test the robustness of
18
19 153 this division, another AMOVA, on the data divided between these 5 genetic groups, is performing.
20
21 154 This reveal that the majority of the total genetic variance (89.82%, $p < 0.001$) occurred among groups,
22
23
24 155 and to a lesser extent within populations (8.21%, $p < 0.001$), with little among population within groups
25
26 156 (1.97%, $p < 0.001$). The distribution of the groups thus obtained is represented geographically in figure
27
28
29 157 3.

30
31 158 Group 5, gathering individuals with *H. t. coccinea* genetic signature, is present all along the
32
33 159 European coasts. It was largely dominant in the Canary Islands, less in south-Brittany and absent in
34
35
36 160 Guernsey Islands and in the Mediterranean sites.

37
38 161 In regards of the 4 groups of *H. t. tuberculata*, the dominant groups 1 and 4 are present in all
39
40 162 study areas. Group 4 seems to become dominant towards the north of the distribution area. Finally,
41
42
43 163 group 2 seems to be specific to the Mediterranean Sea.

44
45 164
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

The mitochondrial gene COI is used as in many intra and interspecific studies for *Haliotis* Genus (An et al 2005; Gruenthal and Burton 2005; Wang et al 2004). This molecular marker reveals only weak nucleotidic diversity et allows to differentiate *Haliotis tuberculata coccinea* and *Haliotis tuberculata tuberculata*. These results confirm those yet published of Clark et al (2007) who have used the 5' end of the COI (NCBI= EF 660361-EF 660363 for *H. t. tuberculata* and EF 660348-660354 for *H. t. coccinea*).

The weak genetic structure existing within the species showed that larval dispersion mode does not make a good predictor of the genetic structure of populations in marine invertebrates (Imron et al. 2007). Short reproductive season may however explain the strong differentiation level (Hamm and Burton 2000) within *H. t. tuberculata* populations.

H. t. coccinea has a relatively simple genetic structure with a haplotype network presenting few mutational steps. That suggests a recent divergence of the sequences around a main haplotype. Only six different haplotypes are found in the Canary and nine in the other areas. Only one haplotype is common to the Canaries, Spain, Brittany and Normandy. It may represent a transition between a group from Canaries specific haplotypes and those from the other areas. *H. t tuberculata* proposes a much more complex structure with several mutational steps and haplotypes. This network organization suggests an ancestral retention of diversity. On the contrary, the important haplotypic divergence found in the Canaries populations, suggests a recent and unstabilized expansion. These results may be explained by the existence, for 900 000 years, of a sequence of successive periods of glaciations and reheating at an approximate frequency of 100 000 years leading to many episodes of insularisation and mixing of the populations.

Although the geographical structure of *H. tuberculata* populations is not obvious, the complexity of the subspecies genetic structure suggests a certain geographical organization. The five genetically distinct groups present specific geographical preferences. Thus, group 3 is more present on the median distribution areas of the species (Spain and the Mediterranean Sea). Group 4 exhibits more representation in the Northern latitudes. Group 2 may be specific to the Mediterranean Sea.

193 *H. t. tuberculata* was found in all the areas surveyed, regardless of the sample sizes suggesting
194 that its prevalence is higher in the overall population.

195 The maternal mitochondrial COI which define *H. t. coccinea* subspecies was present up to its
196 Northern end distribution but its lower prevalence and our sample size at each site didn't allow us to
197 draw definitive conclusion about the presence or absence of this sub-species in Mediterranean, or
198 various places in Brittany.

199 In the sight of the distribution of *H. t. lamellosa* in the Mediterranean Sea according to Mgaya
200 (1995), it is of primary importance to carry out sampling in the Eastern part of the Mediterranean Sea
201 in order to verify the scientific existence of a lamellosa sub-species. Our results showed that only four
202 sequences may refer as *H. t. lamellosa* (haplotype 22), differing by 2 bp but were not distinguishable
203 morphologically from *H. t. tuberculata*. Same results have been reported by Clark et al (2007).
204 Sampling of *H. tuberculata* from southern limit as Senegal coast will be important for a global
205 synthesis.

206 The assumptions about the allopatric character of *H. t. coccinea* subspecies in North-Eastern
207 Atlantic are here denied. In fact, *H. t. coccinea* and *H. t. tuberculata* are sympatric subspecies with a
208 distribution in mixed populations through the Atlantic coast. Their genetic divergence hidden behind a
209 similar phenotypic plasticity translates an incomplete cryptic speciation (Muths D and al., 2006).

210 Regarding the evolutionary history of the two-lineage *tuberculata* and *coccinea*, the challenge
211 is to explain the 1.6 Million years, approximate separation time evaluate by a COI mutation rate of
212 2.4% (Imron et al., 2007), separating those. In phylogeographic point of view (Avise, 2000), *H. t.*
213 *coccinea* may have been isolated from the *tuberculata* clade after the change in currents structure in
214 Southern area of Spain following the opening of the Gibraltar isthmus, 5.3 Million years ago (Doadrio
215 et al 2005 ; Loget and Van den Driessche 2006 ;Warny et al 2003). These currents may be established
216 since the increase of the sea level 1.5 Million years ago, supported by the separation between the
217 African and European continents (Rouchy 1999). The orientation of the dominating Southern currents
218 near the African coasts may have prevented *H. t. coccinea* from developing towards northern latitudes.
219 Regarding *H. t. tuberculata*, coastal currents directed towards the Mediterranean Sea may have
220 prevented the dissemination of larvae toward the African continent. The Last glaciations, occurring

1 221 recently may have affected these currents and the regulation of the larval dispersal. It could be
2
3 222 possible that coastal counter-currents near Africa allowed the larvae to be disseminated passively
4
5 223 towards Spain. However, the larval dispersal being lower than 10 days makes this assumption weaker.
6
7 224 The most likely hypothesis, in the sights of the current relative distribution of both clades, is that more
8
9
10 225 recently, the development of the commercial sea routes have played a role mattering in the
11
12 226 immigration of African larvae toward Spain and Brittany. The larvae could have been thus transferred
13
14 227 imprisoned into the boat ballasts then disseminated in Europe continental coasts. After once crossed
15
16
17 228 the physical barrier which represents Gibraltar, the *coccinea* variety could have been found on all the
18
19 229 Spain and French Atlantic coasts.

20 230

21 231

22 232

23 233

24
25
26 234 **Acknowledgements** France Haliotis (Plougerneau, Brittany) supplied the major part of the Brittany samples. The
27
28 235 sampling in the Canary Islands was carried out by the Canary Aquaculture Research Group (GIA). S.M.E.L. (Syndicat
29
30 236 Mixte pour l'Équipement du Littoral, Manche France) supplies samples from Normandy. The individuals of Guernsey
31
32 237 come from the farm based in Saint Gervais and were supplied by Mrs Amat. Galice and Asturie samples are respectively
33
34 238 given by Susana Soto (Facultad ciencias del mar, Universidad Vigo, Spain) and Carmen Rodríguez (Centro de
35
36 239 Experimentación Pesquera). Mediterranean samples were given by Mr Amouroux and col. (CNRS, Banyuls). Thanks to
37
38 240 Ronan Le Bras and Sébastien Trape (IRD, unite de recherché 070, Dakar) for your precious help for their samples in dive.
39
40 241 We thank also Mathilde van der Merwe (Stellenbosh University, South Africa) for useful comment. This work was
41
42 242 partially supported by ECC (SUDEVAB program for SMEs)
43
44
45
46
47
48
49

50 243

51 244

52 245 **References**

53 246

- 54
55 247 An HS, Jee YJ, MIN KS, KIM BL and HAN SJ (2005) Phylogenetic analysis of six species of pacific
56 248 abalone (Haliotidae) based on DNA sequences of 16s rRNA and cytochrome c oxidase subunit I
57 249 mitochondrial genes. *Mar Biotechnol* (NY) 7: 373-80
58
59 250 Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press,
60 251 Cambridge
252 Azevedo C, Balseiro P, Casal G, Gestal C, Aranguren R, Stokes NA, Carnegie RB, Novoa B, Burreson
253 EM, Figueras A (2006a) Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium*
254 *montforti* n sp, parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata* J. *Invertebr Pathol* 92: 23-32

- 255 Azevedo C, Conchas RF, Tajdari J, Montes J (2006b) Ultrastructural description of new Rickettsia-like
256 organisms in the commercial abalone *Haliotis tuberculata* (Gastropoda: Haliotidae) from the NW
257 of Spain. *Dis Aquat Organ* 71: 233-7
- 258 Balseiro P, Aranguren R, Gestal C, Novoa B, Figueras A (2006) Candidatus *Xenohaliotis*
259 *californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis*
260 *tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*
- 261 Clark NL, Findlay GD, Yi X, MacCoss MJ and Swanson WJ (2007). Duplication and Selection on
262 Abalone Sperm Lysin in an Allopatric Population. *Mol Biol Evol* 24, 2081–2090
- 263 Clavier J and Richard O (1986) Growth of juvenile *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda) in
264 their natural environment. *Journal of the Marine Biological Association, UK* 66: 497-503
- 265 Conod N, Bartlett JP, Evans BS and Elliott NG (2002) Comparison of mitochondrial and nuclear DNA
266 analyses of population structure in the blacklip abalone *Haliotis rubra* Leach. *Mar Freshwater*
267 *Res* 53: 711-718
- 268 Courtois de Vicose G, Viera MP, Bilbao A and Izquierdo MS (2007) Embryonic and larval
269 development of *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve : an indexed micro-photographic sequence. *J*
270 *Shellfish Res* 26: 847-854
- 271 Del Rio Portillae MA (2001) Population genetics of the yellow abalone, *Haliotis corrugata*, in Cedros
272 and San Benito Islands: A preliminary survey. *Journal of Shellfish Research* 20: 765-770
- 273 Dixon CD, Day RW, Huchette SMH and Shepherd SA (2006) Successful seeding of hatchery-
274 produced juvenile greenlip abalone to restore wild stocks. *Fisheries Research* 78: 179-185
- 275 Doadrio I and Perdices A (2005) Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (Cobitis,
276 cobitidae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:
277 484-493
- 278 Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.
279 *Phytochemistry bulletin* 19:11-15
- 280 Elliott NG, Evans B, Conod N, Bartlett J, Officer R and Sweijd N (2000) Application of molecular
281 genetics to the understanding of abalone population structure - Australian and South African case
282 studies. *Journal of Shellfish Research* 19: 510
- 283 Evans B, White RWG, Elliot NG (2000) The use of microsatellite markers for parentage analysis in
284 Australian blacklip and hybrid abalone. *Journal of Shellfish Research* 19: 511
- 285 Evans B, Sweijd NA, Bowie RCK, Cook PA, Elliott NG (2004) Population genetic structure of the
286 perlemoen *Haliotis midae* in South Africa: evidence of range expansion and founder events. *Mar*
287 *Ecol Prog Ser* 270: 163-172
- 288 Excoffier, Laval LG, and Schneider S (2005) Arlequin ver 30: An integrated software package for
289 population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50
- 290 Forster P, Torroni A, Renfrew C, Röhl A (2001) Phylogenetic star contraction applied to Asian and
291 Papuan mtDNA evolution Geiger DL (2000) Distribution and biogeography of Haliotidae
292 (Gastropoda: Vetigastropoda) worldwide. *Bollettino-Malacologico* 35: 57-120
- 293 Giribet G, Wheeler WC (2002) On bivalve phylogeny in a high-level analysis of the bivalvia
294 (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence analysis. *Invert Biol* 121: 271-
295 324
- 296 Gruenthal JM (2008) Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis*
297 *cracherodii* Leach, 1814) a candidate for endangered species status. *Journal of Experimental*
298 *Marine Biology and Ecology* 355: 47-58
- 299 Gruenthal KM and Burton RS (2005) Genetic diversity and species identification in the endangered
300 white abalone (*Haliotis sorenseni*). *Conservation Genetics* V6: 929-939
- 301 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program
302 for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98
- 303 Hamm DE and Burton RS (2000) Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the
304 central California coast *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 254: 235-247
- 305 Hobday A. J, Tegner MJ, Haaker PL (2001). Over-exploitation of a broadcast spawning marine
306 invertebrate: Decline of the white abalone. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 493-514.
- 307 Huang BX, Peakall R, Hanna PJ (2000) Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis*
308 *rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Marine Biology* 136:
309 207-216

- 1 310 Huchette SMH and Clavier J(2004) Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L) industry in Europe.
2 311 Journal of Shellfish Research 23: 951-955
- 3 312 Imron, Jeffrey B, Hale P, Degnan BM, Degnan SM (2007) Pleistocene isolation and recent gene flow
4 313 in *Haliotis asinina*, an Indo-Pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. Molecular
5 314 Ecology 16: 289-304
- 6 315 Jiang, L, Wu WL, Huang PC (1995) The mitochondrial DNA of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor*
7 316 Reeve, 1986. Mol Mar Biol Biotech 4: 469-479
- 8 317 Klinbunga S, Pripue P, Khamnamtong N, Puanglarp N, Tassanakajon A, Jarayabhand P, Hirono I,
9 318 Aoki T, Menasveta P (2003) Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone in
10 319 Thailand. Mar Biotechnol (NY) 5: 505-517
- 11 320 Kumar S, Tamura K and Nei M (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics
12 321 Analysis and Sequence Alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163
- 13 322 Loget N and Van den Driessche (2006) On the origin of the Strait of Gibraltar. Sedimentary Geology 188:341-
14 323 356
- 15 324 Maynard BT, Kerr LJ, McKiernan JM, Jansen ES, Hanna PJ (2005) Mitochondrial DNA sequence and
16 325 gene organization in Australian backup abalone *Haliotis rubra* (leach). Mar Biotechnol (NY) 7:
17 326 645-58
- 18 327 Metz EC, Robles-Sikisaka R, Vacquier VD (1998) Nonsynonymous substitution in abalone sperm
19 328 fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. PNAS, September 1,
20 329 1998; 95: 10676
- 21 330 Mgaya YD, Gosling EM, Mercer JP, Donlon J (1995) Genetic variation at three polymorphic loci in
22 331 wild and hatchery stocks of the abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. Aquaculture 136: 71-80
- 23 332 Muths D, Davoult D, Gentil F and Jollivet D (2006) Incomplete cryptic speciation between intertidal
24 333 and subtidal morphs of *Amphiura brachiata* (Echinodermata: Ophiuridae) in the North East
25 334 Atlantic. Molecular Ecology 15:3303-3318
- 26 335 Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction
27 336 endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA 76, 5269-5273
- 28 337 Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurié J, Thébault A (2002) *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone
29 338 *Haliotis tuberculata*. Diseases of Aquatic Organisms 50: 35-43
- 30 339 Rouchy JM (1999) un événement exceptionnel: la crise de salinité messienne de Méditerranée. In
31 340 fröhlich F & Scubnell H-J (Ed), Les âges de la terre, MNHN, Paris, 104-108
- 32 341 Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism
33 342 analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497
- 34 343 Selvamani MJP, Degnan SM, Paetkau D and Degnan BM (2000) Isolation and characterization of
35 344 microsatellite DNA markers for the tropical abalone, *Haliotis asinina*. Journal of Shellfish
36 345 Research 19: 532
- 37 346 Swanson WJ, Aquadro CF, and Vacquier VD (2001) Polymorphism in abalone fertilization proteins is
38 347 consistent with the neutral evolution of the egg's receptor for lysin (VERL) and positive
39 348 Darwinian selection of sperm lysin. Molecular Biology & Evolution 18: 376-383
- 40 349 Tang S, Pongviwat A, Klinbunga S, Tassanakajon A, Jarayabhand P, Menasveta P (2005) Genetic
41 350 heterogeneity of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) revealed by RAPD and microsatellite
42 351 analyses. J Biochem Mol Biol 38: 182-90
- 43 352 Wang Z, Ho KC, Yu DH, Ke CH, Mak WY, Chu KH (2004) Lack of genetic divergence in nuclear
44 353 and mitochondrial DNA between subspecies of two *Haliotis* species. Journal of Shellfisheries
45 354 Research 23: 1143-1146
- 46 355 Warny SA, Bart PJ and Suc J -P (2003) Timing and progression of climatic, tectonic and
47 356 glacioeustatic influences on the Messinian Salinity Crisis.
48 357 Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 202(1-2): 59-66
- 49 358 Zuniga G, Del Proo SAG, Cisneros R and Rodriguez G (2000) Population genetic analysis of the
50 359 abalone *Haliotis fulgens* (Mollusca: Gastropoda) in Baja California, Mexico. Journal of Shellfish
51 360 Research 19: 853-859

Legend of Tables:

361

1 362

2 363

3 364

Table 1: Presentation of the haplotypes variable sites

4 365

5 366

Table 2: Characteristics of the studied populations

7 367

Number of individuals sequenced (N), haplotypes found (H), haplotypic (Hd) and nucleotidic (π) diversity of

9 368

each station are indicated at the different areas of the sampling

10 369

11 370

Table 3: Haplotypes frequencies and polymorphic sites in each population

12 371

13 372

Table 4 Average number of pairwise differences between populations of *H tuberculata*

17 373

Above diagonal: Average number of pairwise differences between populations; Diagonal elements: Average

18 374

number of pairwise differences within population; Below diagonal: Pairwise Fst values between populations of

19 375

H tuberculata examined in the present study (significant values ($p < 0.05$) are pointed out in bold)

20 376

21 377

22 378

Legend of Figures:

23 379

24 380

25 381

Figure 1 Map showing the location of collecting sites

26 382

27 383

Figure 2 Minimum spanning network showing relationships among 33 haplotypes of mtDNA COI of

28 384

H. tuberculata observed in the present study

29 385

Each crossed connection indicates one mutational step This network is divided into 5 genetically different groups

30 386

31 387

32 388

Figure 3 Map of relative distribution of *H t coccinea* and the preset groups of *H t tuberculata*

33 389

34 390

35 391

36 392

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

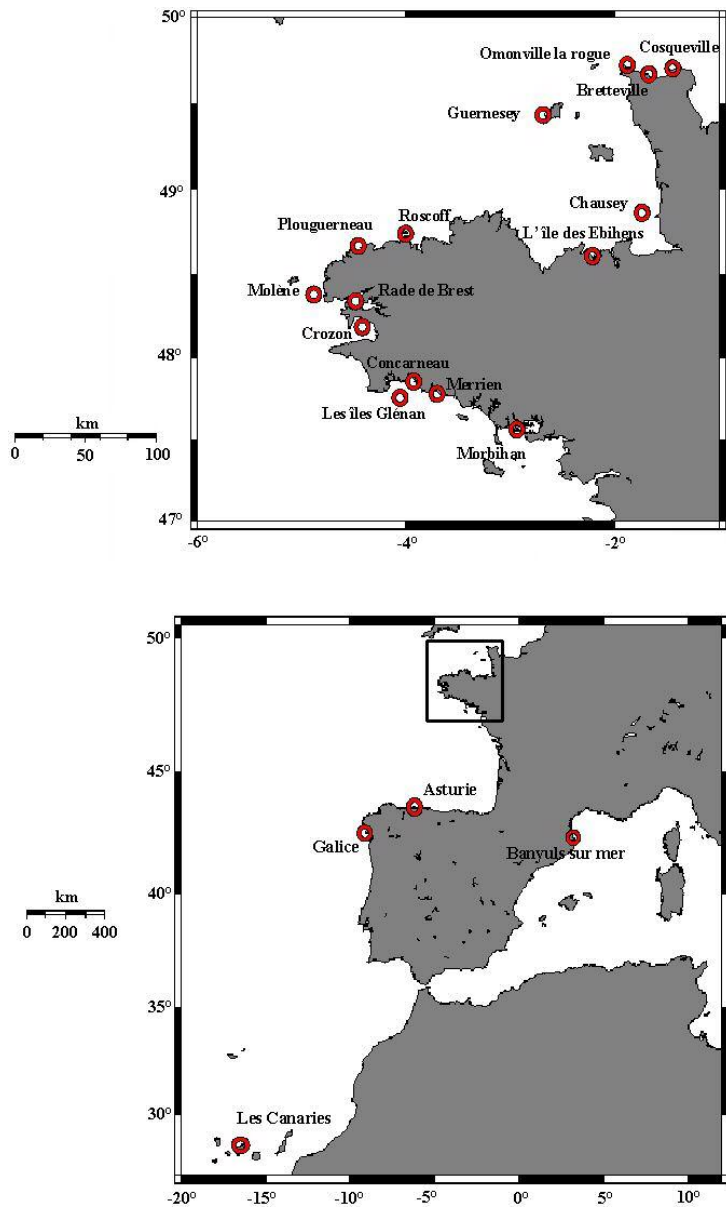


Figure 1 Map showing the location of collecting sites
251x391mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

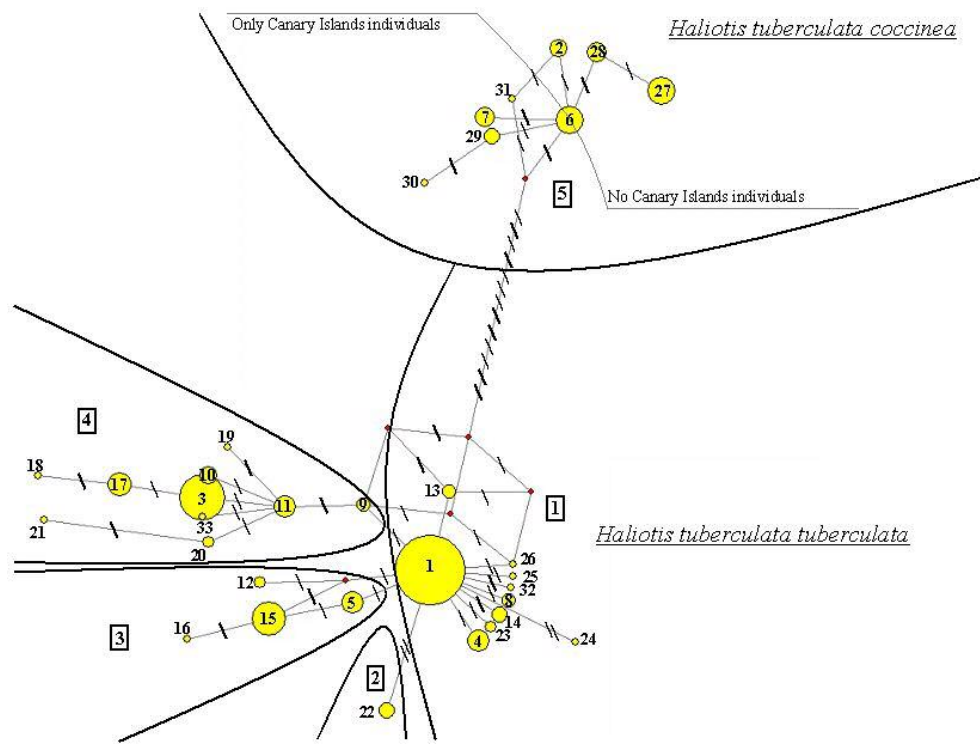
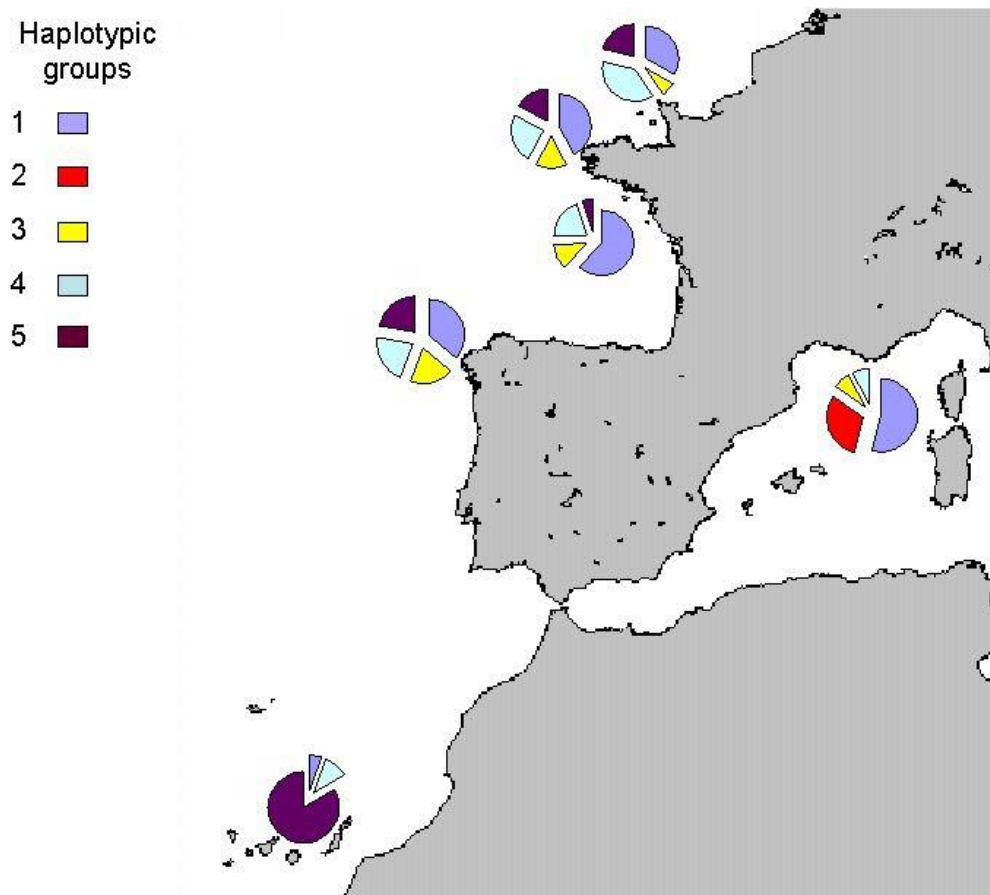


Figure 2 Minimum spanning network showing relationships among 33 haplotypes of mtDNA COI of *H. tuberculata* observed in the present study. Each crossed connection indicates one mutational step This network is divided into 5 genetically different groups
 221x162mm (96 x 96 DPI)

view



38 **Figure 3 Map of relative distribution of *H. t. coccinea* and the preset groups of *H. t.***
39 ***tuberculata***

40 181x161mm (96 x 96 DPI)

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Group	N°	n	%	1111111111 1122222222 2222333333 3444444555 5 0011123345 6902445677 7899002578 9455689000 1 5403685795 7731251326 8439689049 5315757089 5
1	1	75	0.31120	ACCGCTGGTA CTCTAGTGCG GCTACATTCC TACTTCTAGG T
	4	7	0.02905	. . A
	8	3	0.01245	. . . A
	13	3	0.01245 T
	14	4	0.01660 C
	23	2	0.00830 G
	24	1	0.00415 GA
	25	1	0.00415 A
	26	1	0.00415 A
32	1	0.00415 A	
2	22	4	0.01660 A G
	15	20	0.08299 C C
3	5	7	0.02905 C
	12	2	0.00830 C . . C
	16	1	0.00415 C T
4	11	7	0.02905 A G
	3	32	0.13278 A G . . T
	17	9	0.03734 A C G . . T
	10	5	0.02075 A CT
	9	3	0.01245 A
	20	2	0.00830 A T T
	18	1	0.00415 A C A G . . T
	19	1	0.00415	G A T
	21	1	0.00415 A T C T A
33	1	0.00415 CA T	
5	6	12	0.04979	. T . . T . . AC . TC . C T . ATC . T . C . . T CT . G
	27	12	0.04979	. T . . T . . AC . TC . C . A . . T . ATC . T . C . . T CCT . G
	7	6	0.02490	. T . . T . . AC . TC . C . A . . T . ATC . T . C . . T CT . G
	28	6	0.02490	. T . . T . . AC . TC . C . . C . T . ATC . T . C . . T CT . G
	2	5	0.02075	. T . . T . . AC . TC . C T . ATC . T . C . . T CTCG
	29	4	0.01660	. T . . T . . AC . TC . C T . ATC . T . C . . T CT . G . . C . .
	30	1	0.00415	GT . . T . . AC . TC . C T . ATC . T . C . . T CT . G . . C . .
	31	1	0.00415	. T . . T . . AC . TC . C T . ATC . T . C . . T CTC

Table 1 Presentation of the haplotypes variable sites
245x309mm (72 x 72 DPI)

Region	Population	Code	N	h	Hd	Pi	Pi
Normandy	Cosqueville	Cs	10	5	0.867	0.0184	0.0146
	Bretteville	Bt	9	7	0.944	0.0211	
	Omonville-la-Rogue	Olr	12	8	0.894	0.0160	
	Guernsey	Gy	13	3	0.718	0.0035	
	Chausey	Cha	6	5	0.933	0.0120	
North Brittany	Ebihens	Ebe	8	4	0.821	0.0175	0.0111
	Roscoff	Ro	11	5	0.855	0.0182	
	Plougerneau	Pl	11	6	0.8	0.0162	
	Brignogan	Bi	8	4	0.75	0.0026	
	Molène	Mol	13	7	0.872	0.0050	
	Brest	Br	19	9	0.871	0.0078	
South Brittany	Crozon	Cr	3	2	0.667	0.0063	0.0061
	Concarneau	Cc	10	3	0.714	0.002	
	Merrien	Mer	27	9	0.709	0.00776	
Spain	Morbihan	Mor	5	3	0.7	0.0045	0.0147
	Asturie	Ast	20	8	0.863	0.0125	
	Galice	Ga	19	13	0.959	0.0168	
Mediterranean Sea	Banyuls	By	17	9	0.872	0.0053	0.0053
Canaries	Canaries	Can	20	7	0.832	0.0113	0.0113
	TOTAL		241	33	0.870	0.01385	

Table 2 Characteristics of the studied populations. Number of individuals sequenced (N), haplotypes found (H), haplotypic (Hd) and nucleotidic (pi) diversity of each station are indicated at the different areas of the sampling

265x156mm (72 x 72 DPI)

Review

haplotype	Ast	Mol	Can	Cc	Gy	By	Br	Bi	Ebi	Mor	Pl	Ro	Cr	Me	Ga	Cha	Olr	Cs	Bt
1	0,3	0,31		0,6	0,31	0,38	0,33	0,5	0,38	0,6	0,45	0,18		0,52	0,11	0,33	0,33	0,2	0,22
2											0,09			0,04			0,08		0,22
3	0,1	0,15	0,1		0,38	0,06	0,17				0,09	0,27	0,67	0,18	0,05		0,17	0,2	0,11
4	0,1		0,05			0,06									0,11	0,17	0,08		
5	0,05													0,07	0,05	0,17	0,08	0,1	
6			0,25				0,06				0,18				0,11		0,08		
7			0,3														0,08		
8							0,11									0,17			
9																		0,2	
10												0,18			0,05				0,11
11	0,05	0,08									0,09			0,04	0,11				0,11
12	0,05						0,06									0,17			
13								0,13			0,09								
14								0,13	0,25						0,05				
15	0,2	0,23		0,2		0,06	0,17	0,25		0,2	0,09		0,33	0,04					
16															0,05				
17		0,08			0,31				0,13	0,2				0,04	0,05				
18							0,06												
19						0,06													
20						0,06									0,05				
21						0,06													
22				0,2		0,19													
23																			
24						0,06													
25																			
26							0,06								0,05				
27	0,15								0,25			0,27						0,3	0,11
28														0,04	0,16		0,08		0,11
29			0,2																
30			0,05																
31			0,05																
32			0,08																
33			0,08																
polymorphic site	24	8	24	3	4	14	25	4	22	6	22	22	5	26	26	18	24	22	23

Table 3 Haplotypes frequencies and polymorphic sites in each population
236x210mm (72 x 72 DPI)

	Ast	Mol	Can	Cc	Gy	By	Br	Bi	Ebi	Mor	Pl	Ro	Cr	Me	Ga	Cha	Olr	Cs	Bt
Ast	6,65	4,88	14,61	4,24	5,43	5,16	5,47	4,29	7,60	4,56	7,49	8,27	5,40	5,45	7,87	6,10	7,45	8,16	10,02
Mol	0,03	2,64	16,11	2,11	2,64	2,84	3,38	2,21	6,58	2,28	6,40	7,13	2,72	3,36	6,73	4,67	6,26	7,28	9,67
Can	0,57	0,71	5,98	16,00	15,67	16,44	15,62	15,94	13,15	15,80	12,45	12,96	16,53	14,89	12,79	13,30	12,92	12,46	10,77
Cc	0,05	0,11	0,74	1,07	2,98	2,14	2,87	1,15	6,00	1,64	5,89	7,13	3,00	2,91	6,43	3,87	5,73	7,04	9,56
Gy	0,19	0,15	0,73	0,50	1,85	3,24	3,68	3,13	6,79	2,63	6,57	6,84	2,28	3,46	6,70	5,15	6,36	7,28	9,42
By	0,08	0,04	0,73	0,07	0,27	2,81	3,69	2,28	6,78	2,53	6,62	7,57	3,47	3,60	6,99	4,75	6,43	7,66	10,01
Br	-0,01	-0,04	0,67	0,02	0,14	0,03	4,37	2,96	7,00	3,11	6,82	7,66	3,78	4,13	7,21	5,19	6,69	7,71	9,89
Bi	0,01	0,08	0,72	-0,05	0,48	0,06	0,00	1,36	6,00	1,75	5,95	7,16	3,08	3,03	6,49	3,92	5,81	7,08	9,58
Ebi	-0,04	0,13	0,45	0,17	0,24	0,17	0,06	0,11	9,29	6,20	8,16	8,84	7,17	6,79	8,49	7,13	8,17	8,70	9,97
Mor	-0,05	-0,11	0,68	-0,01	0,22	-0,04	-0,12	-0,05	0,01	2,40	6,09	7,04	2,80	3,11	6,51	4,27	5,93	7,08	9,49
Pl	-0,01	0,13	0,43	0,17	0,22	0,17	0,07	0,13	-0,09	0,03	8,58	8,64	6,94	6,55	8,22	6,82	7,85	8,53	9,58
Ro	0,02	0,15	0,42	0,23	0,17	0,21	0,10	0,19	-0,07	0,07	-0,06	9,67	7,18	7,34	8,81	7,88	8,68	8,93	9,96
Cr	-0,01	-0,07	0,67	0,42	-0,05	0,14	-0,06	0,35	0,02	0,00	0,04	-0,02	3,33	3,75	7,12	5,44	6,78	7,53	9,96
Me	0,02	-0,01	0,67	0,06	0,11	0,03	-0,03	0,04	0,06	-0,08	0,06	0,10	-0,02	4,12	6,90	4,99	6,41	7,44	9,41
Ga	0,01	0,12	0,42	0,17	0,17	0,15	0,08	0,14	-0,07	0,04	-0,07	-0,05	0,02	0,06	8,91	7,28	8,22	8,78	9,83
Cha	-0,07	0,08	0,54	0,10	0,28	0,09	-0,02	0,04	-0,11	-0,05	-0,11	-0,03	0,05	-0,03	-0,07	6,40	6,78	7,73	9,30
Olr	-0,01	0,11	0,45	0,15	0,19	0,14	0,05	0,11	-0,09	0,01	-0,09	-0,05	0,02	0,04	-0,06	-0,11	8,52	8,58	9,74
Cs	0,00	0,17	0,39	0,23	0,23	0,22	0,11	0,19	-0,10	0,07	-0,08	-0,09	0,02	0,11	-0,06	-0,06	-0,06	9,78	9,87
Bt	0,13	0,32	0,24	0,37	0,35	0,37	0,26	0,33	-0,03	0,21	-0,03	-0,05	0,15	0,26	-0,02	0,04	-0,01	-0,06	11,22

Table 4 Average number of pairwise differences between populations of *H. tuberculata*. Above diagonal: Average number of pairwise differences between populations; Diagonal elements: Average number of pairwise differences within population; Below diagonal: Pairwise Fst values between populations of *H. tuberculata* examined in the present study (significant values ($p < 0.05$) are pointed out in bold)

317x141mm (72 x 72 DPI)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguirre-Guzman, G., H. Ruiz and F. Ascencio (2004). "A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp." Aquaculture Research **35**: 1395-1404.
- Aguirre-Guzmán, G., R. Vázquez-Juárez and F. Ascencio (2001). "Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamei*) to Four *Vibrio* Species." Journal of Invertebrate Pathology **78**(4): 215-219.
- Alabi, A. O., D. A. Jones and J. W. Latchford (1999). "The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*." Aquaculture **178**: 1-11.
- Alam, M., N. A. Hasan, A. Sadique, N. A. Bhuiyan, K. U. Ahmed, S. Nusrin, G. B. Nair, A. K. Siddique, R. B. Sack, D. A. Sack, A. Huq and R. R. Colwell (2006). "Seasonal Cholera Caused by *Vibrio cholerae* Serogroups O1 and O139 in the Coastal Aquatic Environment of Bangladesh." Applied and Environmental Microbiology **72**(6): 4096-4104.
- Alcaide, E., C. Gil-Sanz, E. Sanjuan, D. Esteve, C. Amaro and L. Silveira (2001). "*Vibrio harveyi* causes disease in seahorse." Journal of Fish Diseases **24**: 311-313.
- Allam, B. and C. Paillard (1998). "Defense factors in clam extrapallial fluids." Diseases of Aquatic Organisms **33**: 123-128.
- Allam, B., C. Paillard and M. Auffret (2000). "Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*." Journal of Invertebrate Pathology **76**(1): 63-69.
- Allam, B., K. A. Ashton-Alcox and S. E. Ford (2001). "Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams." Developmental and Comparative Immunology **25**(5-6): 365-75.
- An, H. S., Y. J. Jee, K. S. Min, B. L. Kim and S. J. Han (2005). "Phylogenetic analysis of six species of pacific abalone (*Haliotidae*) based on DNA sequences of 16s rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes." Marine Biotechnologies (NY) **7**(4): 373-80.
- Anguiano, B. C., Searcy-Bernal. R. and P. M. L. Lizarraga (1998). "Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*." Diseases of Aquatic Organisms **33**(2): 119-122.
- Antonio, D. B., K. B. Andree, J. D. Moore, C. S. Friedman and R. P. Hedrick (2000). "Detection of Rickettsiales-like Prokaryotes by in Situ Hybridization in Black Abalone, *Haliotis cracherodii*, with Withering Syndrome." Journal of Invertebrate Pathology **75**(2): 180-182.
- Auffret, M. (1988). Bivalve hemocyte morphology. Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs. W. S. Fisher. Bethesda, MD, American Fisheries Society. **18**: 169-177.
- Austin, B., A. C. Pride and G. A. Rhodie (2003). "Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*." Journal of Fish Disease **26**(1): 55-8.
- Austin, B. and X. H. Zhang (2006). "*Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates." Letters in applied Microbiology **43**(2): 119-24.
- Azevedo, C., P. Balseiro, G. Casal, C. Gestal, R. Aranguren, N. A. Stokes, R. B. Carnegie, B. Novoa, E. M. Burreson and A. Figueras (2006a). "Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*." Journal of Invertebrate Pathology **92**(1): 23-32.
- Azevedo, C., R. F. Conchas, J. Tajdari and J. Montes (2006b). "Ultrastructural description of new Rickettsia-like organisms in the commercial abalone *Haliotis tuberculata* (Gastropoda: Haliotidae) from the NW of Spain." Disease Aquatic Organisms **71**(3): 233-7.

- Azevedo, C., G. Casal and J. Montes (2008). "Ultrastructural developmental cycle of *Haplosporidium montforti* (phylum Haplosporidia) in its farmed abalone host, *Haliotis tuberculata* (Gastropoda)." Journal of Parasitology **94**(1): 137-42.
- Babcock, R. and J. Keesing (1999). "Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevigata*: laboratory and field studies." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **56**: 1668-1678.
- Babior, B. M. (1999). "NADPH oxidase: an update." Blood **93**(5): 1464-76.
- Bachère, E., E. Mialhe, D. Noël, V. Boulo, A. Morvan and J. Rodriguez (1995). "Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology." Aquaculture **132**: 17-32.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier and B. Romestand (2004). "Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*." Immunological Reviews **198**: 149-68.
- Baker, M. C. and P. A. Tayler (2001). "Fertilization success in the commercial gastropod *Haliotis tuberculata*." Marine Ecology Progress Series **211**: 205-213.
- Bally, M. and J. Garrabou (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.
- Balseiro, P., R. Aranguren, C. Gestal, B. Novoa and A. Figueras (2006). "Candidatus *Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe." Aquaculture **258**(1-4): 63-72.
- Banin, E., D. Vassilakos, E. Orr, R. J. Martinez and E. Rosenberg (2003). "Superoxide Dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*." Current Microbiology **46**: 418-422.
- Bassler, B. L. (1999). "How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing." Current Opinion in Microbiology **2**(6): 582-7.
- Bassler, B. L. (2004). "Cell-to-cell communication in bacteria: a chemical discourse." Harvey Lect **100**: 123-42.
- Basuyaux, O. (1997). "Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques sur la croissance de l'ormeau *Haliotis tuberculata* en circuit semi-fermé." Thèse de doctorat de l'Université de Caen.
- Bay, L., J. L. Larsen and J. J. Leisner (2007). "Distribution of three genes involved in the PJM1 iron-sequestering system in various *Vibrio anguillarum* serogroups." Systematics and Applied Microbiology **30**(2): 85-92.
- Bayne, C. J. (1990). "Phagocytosis and non self recognition in invertebrate." BioScience **40**(10): 723-731.
- Beatson, S. A., T. Minamino and M. J. Pallen (2006). "Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure." Trends in Microbiology **14**(4): 151-155.
- Belhsen, O. K. (2000). "Etude cytologique de la gamétogenèse, du système nerveux central et du cycle de reproduction de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*." Thèse de doctorat de l'Université de Caen.
- Ben-Haim, Y., F. L. Thompson, C. C. Thompson, M. C. Cnockaert, B. Hoste, J. Swings and E. Rosenberg (2003). "*Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53**: 309-315.
- Bevelander, G. (1988). Abalone: gross and fine structure. Pacific Grove, USA, The Boxwood Press.
- Bezemer, B., D. Butt, J. Nell, R. Adlard and D. Raftos (2006). "Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters." Fish & Shellfish Immunology **20**(4): 627-36.

- Bhattacharjee, R. N., K. S. Park, Y. Kumagai, K. Okada, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, H. Kumar, T. Kawai, T. Iida, T. Honda, O. Takeuchi and S. Akira (2006). "VP1686, a *Vibrio* type III secretion protein, induces toll-like receptor-independent apoptosis in macrophage through NF-kappaB inhibition." Journal of Biological Chemistry **281**(48): 36897-904.
- Bhattacharjee, R. N., K. S. Park, X. Chen, T. Iida, T. Honda, O. Takeuchi and S. Akira (2008). "Translocation of VP1686 upregulates RhoB and accelerates phagocytic activity of macrophage through actin remodeling." Journal of Microbial Biotechnologies **18**(1): 171-5.
- Boardman, B. K., B. M. Meehan and K. J. Fullner Satchell (2007). "Growth phase regulation of *Vibrio cholerae* RTX toxin export." Journal of Bacteriology **189**(5): 1827-35.
- Boltner, D., C. MacMahon, J. T. Pembroke, P. Strike and A. M. Osborn (2002). "R391: a Conjugative Integrating Mosaic Comprised of Phage, Plasmid, and Transposon Elements." Journal of Bacteriology **184**(18): 5158-5169.
- Bower, S. M. (1987). "Pathogenicity and host specificity of *Labyrinthuloides haliotidis* (Protozoa: Labyrinthomorpha), a parasite of juvenile abalone." Canadian Journal of Zoology **65**(8): 2008-2012.
- Bower, S. M., N. McLean and D. J. Whitaker (1989). "Mechanism of infection by *Labyrinthuloides haliotidis* (Protozoa: Labyrinthomorpha), a parasite of abalone (*Haliotis kamtschatkana*) (Mollusca: Gastropoda)." Journal of Invertebrate Pathology **53**(3): 401-409.
- Bower, S. M. (2001). "Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially." <http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/>
- Bower, S. M. (2005). "Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Labyrinthuloides haliotidis* of abalone." from http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/labhalab_e.html.
- Braid, B. A., J. D. Moore, T. T. Robbins, R. P. Hedrick, R. S. Tjeerdema and C. S. Friedman (2005). "Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply, and exposure to the agent of withering syndrome." Journal of Invertebrate Pathology **89**(3): 219-31.
- Burresson, E. M. and S. E. Ford (2004). "A review of recent information on the *Haplosporidia*, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease)" Aquating Living Resources **17**(4): 499-517.
- Caceres-Martinez, J. and G. D. Tinoco-Orta (2001). "Symbionts of red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, Mexico." Journal of Shellfish Research **20**(2): 875-881.
- Cai, J., Y. Han and Z. Wang (2006). "Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities." Aquaculture **257**(1-4): 161-166.
- Campbell, M. S. and A. C. Wright (2003). "Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters." Applied and Environmental Microbiology **69**(12): 7137-44.
- Canesi, L., M. Betti, C. Ciacci, A. Scarpato, B. Citterio, C. Pruzzo and G. Gallo (2002a). "Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases." Developmental & Comparative Immunology **26**(4): 325-34.
- Canesi, L., G. Gallo, M. Gavioli and C. Pruzzo (2002b). "Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves." Microscopy Research and Technique **57**(6): 469-76.

- Canesi, L., A. Scarpato, M. Betti, C. Ciacci, C. Pruzzo and G. Gallo (2002c). "Bacterial killing by Mytilus hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence." Marine environmental research **54**(3-5): 547-51.
- Canesi, L., M. Betti, C. Ciacci, L. C. Lorusso, G. Gallo and C. Pruzzo (2005). "Interactions between Mytilus haemocytes and different strains of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1 El Tor: role of kinase-mediated signalling." Cellular Microbiology **7**(5): 667-74.
- Cerda-Cuellar, M., L. Permin, J. L. Larsen and A. R. Blanch (2001). "Comparison of selective media for the detection of *Vibrio vulnificus* in environmental samples." Journal of Applied Microbiology **91**(2): 322-7.
- Chakraborty, S., G. B. Nair and S. Shinoda (1997). "Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment." Reviews on Environmental Health **12**(2): 63-80.
- Chang, P. H., S. T. Kuo, S. H. Lai, H. S. Yang, Y. Y. Ting, C. L. Hsu and H. C. Chen (2005). "Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan." Disease Aquatic Organisms **65**(1): 23-7.
- Charlet, M., S. Chernysh, H. Philippe, C. Hetru, J. A. Hoffmann and P. Bulet (1996). "Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*." Journal of Biological Chemistry **271**(36): 21808-13.
- Chatterjee, S. N. and K. Chaudhuri (2006). "Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*: III. Biological functions." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) **1762**(1): 1-16.
- Chen, B., L. Xu, Z. Guo and H. Yang (2004). "A new species of *Cryptobia* sp. n. (Kinetoplastida, Bodinina, Bodonidae) found in the blood of the farmed abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve." Journal of Shellfish Research **23**: 1169-1171.
- Chen, C.-Y., K.-M. Wu, Y.-C. Chang, C.-H. Chang, H.-C. Tsai, T.-L. Liao, Y.-M. Liu, H.-J. Chen, A. B.-T. Shen, J.-C. Li, T.-L. Su, C.-P. Shao, C.-T. Lee, L.-I. Hor and S.-F. Tsai (2003). "Comparative Genome Analysis of *Vibrio vulnificus*, a Marine Pathogen." Genome Research **13**(12): 2577-2587.
- Chen, F. R., P. C. Liu and K. K. Lee (1999). "Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*." Microbios **98**(390): 95-111.
- Chen, F. R., P. C. Liu and K. K. Lee (2000). "Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in kuruma prawn *Penaeus japonicus*." Z Naturforsch **55**(1-2): 94-9.
- Chen, M., H. Yang, M. Delaporte and S. Zhao (2007). "Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge." Aquaculture **271**(1-4): 479-487.
- Cheng, T. C. (1981). Bivalves. Invertebrate Blood Cells. N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley. London, Academic Press. **1**: 233-299.
- Cheng, T. C. (1996). Hemocytes: form and functions. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Kennedy, Newell and Eble. Maryland Sea Grant, College Park, MD, USA: 299-333.
- Cheng, W., I. S. Hsiao and J. C. Chen (2004a). "Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*." Fish & Shellfish Immunology **17**(3): 193-202.
- Cheng, W., I. S. Hsiao and J. C. Chen (2004b). "Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*." Disease of Aquatic Organisms **60**(2): 157-64.

- Cheng, W., I. S. Hsiao, C. H. Hsu and J. C. Chen (2004c). "Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*." Fish & Shellfish Immunology **17**(3): 235-43.
- Cheng, W., F. M. Juang and J. C. Chen (2004d). "The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels." Fish & Shellfish Immunology **16**(3): 295-306.
- Chu, F.-L. and J. L. La Peyre (1993). "Development of the disease caused by the parasite, *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA." Journal of Shellfish Research **12**(1): 21-28.
- Chu, F.-L. E. (2000). Defense mechanisms of marine bivalves. Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and pathology. M. Fingerhahn and R. Nagabhushanam. Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, Sciences publishers: 1-42.
- Clark, N. L., G. D. Findlay, X. Yi, M. J. MacCoss and W. J. Swanson (2007). "Duplication and Selection on Abalone Sperm Lysin in an Allopatric Population." Molecular Biology & Evolution **24**(9): 2081–2090.
- Clavier, J. and O. Richard (1985). Etude sur les ormeaux dans la région de Saint Malo. Dinard, Association pour la mise en valeur du littoral de la côte d'émeraude.
- Cochard, J. C. and J. P. Flasse (1981). Review on the abalone (*Haliotis tuberculata*). Ocean ranching and restocking. Aquaculture extensive et repeuplement, Centre National pour l'Exploitation des Océans, France.
- Cochenneq-Laureau, N., M. Auffret, T. Renault and A. Langlade (2003). "Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*." Journal of Invertebrate Pathology **83**(1): 23-30.
- Colquhoun, D. J. and H. Sorum (2001). "Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*." Microbial Pathogenesis **31**(5): 213-219.
- Colwell, R. R. (2004). "infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease." International Microbiology **7**(4): 285-289.
- Comeau, A. M., E. Buenaventura and C. A. Suttle (2005). "A Persistent, Productive, and Seasonally Dynamic *Vibriophage* Population within Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*)." Applied and Environmental Microbiology: 5324–5331.
- Conejero, M. J. and C. T. Hedreyda (2003). "Isolation of partial toxR gene of *Vibrio harveyi* and design of toxR-targeted PCR primers for species detection." Journal of Applied Microbiology **95**(3): 602-11.
- Conejero, M. J. and C. T. Hedreyda (2004). "PCR detection of hemolysin (vhh) gene in *Vibrio harveyi*." Journal of General and Applied Microbiology **50**(3): 137-42.
- Conte, A. and E. Ottaviani (1995). "Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes." FEBS Letters **365**(2-3): 120-4.
- Cooper, E. L. and P. Roch (1986). "Second-set allograft responses in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Kinetics and characteristics." Transplantation **41**(4): 514-20.
- Courtois, G., M. P. Viera, A. Bilbao and M. S. Izquierdo (2007). "Embryonic and larval development of *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve: an indexed micro-photographic sequence." Journal of Shellfish Research **26**(3): 847-854.
- Croft, D. R. (1929). *Haliotis*. Liverpool Marine Biology Committee Memoirs. Thesis from London University.
- Crosa, J. H., M. H. Schiewe and S. Falkow (1977). "Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen *Vibrio anguillarum*." Infection and Immunity **18**(2): 509-13.

- Crosa, J. H. (1980). "A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system." Nature **284**(5756): 566-8.
- Crosa, J. H., L. L. Hodges and M. H. Schiewe (1980). "Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*." Infection and Immunity **27**(3): 897-902.
- Crosa, J. H. (1989). "Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria." Microbiology Reviews **53**(4): 517-30.
- Crosa, J. H. and C. T. Walsh (2002). "Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria." Microbiology and Molecular Biology Reviews **66**(2): 223-49.
- Croxatto, A., V. J. Chalker, J. Lauritz, J. Jass, A. Hardman, P. Williams, M. Camara and D. L. Milton (2002). "VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*." Journal of Bacteriology **184**(6): 1617-29.
- Czyz, A., J. Jasiński, A. Bogdan, H. Szpilewska and G. Wegrzyn (2000). "Genetically modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollution of marine environments." Applied and Environmental Microbiology **66**(2): 599-605.
- Czyz, A., H. Szpilewska, R. Dutkiewicz, W. Kowalska, A. Biniewska-Godlewska and G. Wegrzyn (2002). "Comparison of the Ames test and a newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments." Mutation Research **519**(1-2): 67-74.
- Czyz, A., W. Kowalska and G. Wegrzyn (2003). "*Vibrio harveyi* mutagenicity assay as a preliminary test for detection of mutagenic pollution of marine water." Bull Environ Contam Toxicol **70**(6): 1065-70.
- da Silva, P. M., P. Comesana, J. Fuentes and A. Villalba (2008). "Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*." Fish and Shellfish Immunology **24**(5): 551-563.
- Daume, S. (2006). "The roles of bacteria and micro and macro algae in abalone aquaculture: a review." Journal of Shellfish Research **25**(1): 151-157.
- Davis, B. M. and M. K. Waldor (2003). "Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*." Current Opinion in Microbiology **6**(1): 35-42.
- Day, R., C. Culver, A. Kuris, A. Belcher and D. Morse (2000). "The parasite *Terebrasabella heterouncinata* (Polychaeta) manipulates shell synthesis in *Haliotis rufescens*." Journal of Shellfish Research **19**(1): 507.
- Defoirdt, T., P. Bossier, P. Sorgeloos and W. Verstraete (2005). "The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*." Environ Microbiol **7**(8): 1239-47.
- Defoirdt, T., R. Crab, T. K. Wood, P. Sorgeloos, W. Verstraete and P. Bossier (2006). "Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates." Applied and Environmental Microbiology **72**(9): 6419-23.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete and P. Bossier (2007a). "Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work." International Society for Microbial Ecology **2**(1): 19-26.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete and P. Bossier (2007b). "Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example." Trends in Biotechnology **25**(10): 472-479.

- Delaporte, M., P. Soudant, J. Moal, C. Lambert, C. Quere, P. Miner, G. Choquet, C. Paillard and J. F. Samain (2003). "Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species-*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*." Journal of Experimental Biology **206**(Pt 17): 3053-64.
- Delaporte, M., P. Soudant, C. Lambert, J. Moal, S. Pouvreau and J. F. Samain (2006a). "Impact of food availability on energy storage and defense related to hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle." Aquaculture **254**: 571-582.
- Delaporte, M., P. Soudant, J. Moal, E. Giudicelli, C. Lambert, C. Segueineau and J. F. Samain (2006b). "Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." Lipids **41**(6): 567-76.
- Denkin, S. M. and D. R. Nelson (2004). "Regulation of *Vibrio anguillarum* empA metalloprotease expression and its role in virulence." Applied and Environmental Microbiology **70**(7): 4193-204.
- DePaola, A., J. L. Nordstrom, A. Dalsgaard, A. Forslund, J. Oliver, T. Bates, K. L. Bourdage and P. A. Gulig (2003). "Analysis of *Vibrio vulnificus* from market oysters and septicemia cases for virulence markers." Applied and Environmental Microbiology **69**(7): 4006-11.
- Di Lorenzo, M., M. Stork, M. E. Tolmasky, L. A. Actis, D. Farrell, T. J. Welch, L. M. Crosa, A. M. Wertheimer, Q. Chen, P. Salinas, L. Waldbeser and J. H. Crosa (2003). "Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775." Journal of Bacteriology **185**(19): 5822-30.
- Diggles, B. K., G. A. Moss, J. Carson and C. D. Anderson (2000). "Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*." Diseases of Aquatic Organisms **43**: 127-137.
- Diggles, B. K., J. Nichol, P. M. Hin, S. Wakefield, N. Cochenec-Laureau, R. D. Roberts and C. S. Friedman (2002). "Pathology of cultured paua *Haliotis iris* infected with a novel haplosporidian parasite, with some observations on the course of disease." Disease Aquatic Organisms **50**(3): 219-31.
- Dong, Y., H. E. Taylor and G. Dimopoulos (2006). "AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system." PLoS Biol **4**(7): e229.
- Dorsey, C. W., A. P. Tomaras, P. L. Connerly, M. E. Tolmasky, J. H. Crosa and L. A. Actis (2004). "The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related." Microbiology **150**(Pt 11): 3657-67.
- Drake, S. L., D. Elhanafi, W. Bang, M. A. Drake, D. P. Green and L. A. Jaykus (2007). "Validation of a green fluorescent protein labeled strain of *Vibrio vulnificus* for use in the evaluation of post-harvest strategies for handling of raw oysters." Applied and Environmental Microbiology.
- Dunn, A. K., M. O. Martin and E. V. Stabb (2005). "Characterization of pES213, a small mobilizable plasmid from *Vibrio fischeri*." Plasmid **54**(2): 114-34.
- Dziejman, M., D. Serruto, V. C. Tam, D. Sturtevant, P. Diraphat, S. M. Faruque, M. H. Rahman, J. F. Heidelberg, J. Decker, L. Li, K. T. Montgomery, G. Grills, R. Kucherlapati and J. J. Mekalanos (2005). "Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system." PNAS **102**(9): 3465-70.

- Ekanayake, P. M., H. S. Kang, M. De Zyosa, Y. Jee, Y. H. Lee and J. Lee (2006). "Molecular cloning and characterization of Mn-superoxide dismutase from disk abalone (*Haliotis discus discus*)."
Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **145**(3-4): 318-24.
- Ekanayake, P. M., M. De Zoysa, H.-S. Kang, Q. Wan, Y. Jee, Y.-H. Lee, S.-J. Kim and J. Lee (2008). "Cloning, characterization and tissue expression of disk abalone (*Haliotis discus discus*) catalase." Fish & Shellfish Immunology **24**(3): 267-278.
- Elston, R. and G. S. Lockwood (1983). "Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson." Journal of Fish Disease **6**(2): 111-128.
- Erasmus, J. H., P. A. Cook and V. E. Coyne (1997). "The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*." Aquaculture **155**(1-4): 377-386.
- Erauso, G., F. Lakhal, A. Bidault-Toffin, M. Koken, M. El Bour, P. Le Chevalier, A. Jacq and C. Paillard (Soumis). "Complete sequence of pVT1, a large mosaic conjugative plasmid from the clam pathogen, *Vibrio tapetis*."
- Esnault, S. and F. Barraer (2005). Etude chronologique des températures de la mer sur l'ouest de la France. Rapport de l'IUT de l'Université de Bretagne Sud
- Evans, B., R. W. G. White and N. G. Elliott (2000). "The use of microsatellite markers for parentage analysis in Australian blacklip and hybrid abalone." Journal of Shellfish Research **19**(1): 511.
- Fabbri, A., L. Falzano, C. Frank, G. Donelli, P. Mataresse, F. Raimondi, A. Fasano and C. Fiorentini (1999). "*Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells." Infection and Immunity **67**(3): 1139-1148.
- Faruque, S. M., I. Bin Naser, K. Fujihara, P. Diraphat, N. Chowdhury, M. Kamruzzaman, F. Qadri, S. Yamasaki, A. N. Ghosh and J. J. Mekalanos (2005). "Genomic sequence and receptor for the *Vibrio cholerae* phage KSF-1phi: evolutionary divergence among filamentous vibriophages mediating lateral gene transfer." Journal of Bacteriology **187**(12): 4095-103.
- Fisher, W. S. (1988). Environmental influence on bivalve hemocyte function. Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs. W. S. Fisher. Bethesda, MD, American Fisheries Society. **18**: 225-237.
- Fleury, C., F. Marin, B. Marie, G. Luquet, J. Thomas, C. Josse, A. Serpentine and J. M. Lebel (2008). "Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and microstructural study." Tissue and Cell **40**(3): 207-218.
- Flye-Sainte-Marie, J. (2007). "Approche écophysiologique de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* : expérimentations et modélisation." Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale.
- Ford, S. E. (1985). "Chronic infections of *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the oyster *Crassostrea virginica*." Journal of Invertebrate Pathology **45**: 94-107.
- Ford, S. E. (1986). "Comparison of hemolymph proteins between resistant and susceptible oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX)." Journal of Invertebrate Pathology **47**: 283-294.
- Ford, S. E. and H. H. Haskin (1987). "Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX)." Journal of Parasitology **73**: 368-376.
- Ford, S. E., S. A. Kanaley and D. T. J. Littlewood (1993). "Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes." Journal of Invertebrate Pathology **61**(1): 49-57.

- Ford, S. E. and C. Paillard (2006). "Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*." Fish & Shellfish Immunology.
- Friedman, C. S., G. R. Gardner, R. P. Hedrick, M. Stephenson, R. J. Cawthorn and S. J. Upton (1995). "*Pseudoklossia haliotis* sp. n. (Apicomplexa) from the kidney of California abalone, *Haliotis* spp. (Mollusca)." Journal of Invertebrate Pathology **66**(1): 33-38.
- Friedman, C. S., K. B. Andree, K. A. Beauchamp, J. D. Moore, T. T. Robbins, J. D. Shields and R. P. Hedrick (2000). "'Candidatus *Xenohaliotis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America." International journal of systematic and evolutionary microbiology **50 Pt 2**: 847-55.
- Fukasawa, S., K. Nakamura, M. Miyahira and M. Kurata (1988). "Some properties of two proteinases from a liminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLN-108." Agricultural and biological chemistry **52**(12): 3009-3014.
- Fukui, Y. and T. Sawabe (2008). "Rapid Detection of *Vibrio harveyi* in Seawater by Real-Time PCR." Microbes and Environment **23**: 172-176.
- Fullner, K. J. and J. J. Mekalanos (2000). "In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin." Embo Journal **19**(20): 5315-23.
- Gagnaire, B., P. Soletchnik, P. Madec, P. Geaizon, O. Le Moine and T. Renault (2006). "Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters." Aquaculture **54**: 606–616.
- Garnier, M., Y. Labreuche, C. Garcia, M. Robert and J. L. Nicolas (2007). "Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*." Microbial Ecology **53**: 187–196.
- Gauger, E. J. and M. Gomez-Chiarri (2002). "16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*." Diseases of Aquatic Organisms **52**(1): 39-46.
- Geiger, D. L. (1999). "A total evidence of cladistic analysis of the Haliotidae (Gastropoda: vetigastropoda)." Thesis of the University of Southern California.
- Geiger, D. L. (2000). "Distribution and biogeography of *Haliotidae* (Gastropoda: Vetigastropoda) worldwide." Bollettino-Malacologico **35**: 57-120.
- Gestal, C., M. Costa, A. Figueras and B. Novoa (2007). "Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides." Gene **406**(1-2): 134-143.
- Goarant, C., J. Herlin, R. Brizard, A. L. Marteau, C. Martin and B. Martin (2000). "Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp." Diseases of Aquatic Organisms **40**(2): 101-7.
- Goarant, C. and F. Merien (2006). "Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry." Journal of Microbiological Methods **67**(1): 27-35.
- Goarant, C., Y. Reynaud, D. Ansquer, S. de Decker, D. Saulnier and F. le Roux (2006). "Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia." Systematics and Applied Microbiology **29**(7): 570-80.
- Goggin, C. L., K. B. Sewell and R. G. J. Lester (1989). "Cross-infection experiments with Australian *Perkinsus* species." Diseases of Aquatic Organisms **7**: 55-59.
- Goggin, C. L. and R. J. G. Lester (1995). "*Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Victoria: A review." Marine and Freshwater Research **46**(3): 639-646.

- Gonzalez, M. (2005). "Etude de la réponse immunitaire de l'huître *Crassostrea gigas* : caractérisation et fonctions des protéines de reconnaissance aux LPS et d'effecteurs antimicrobiens." Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier II: 168.
- Gonzalez, M., Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzon, B. Romestand, J. Fievet, M. Pugniere, F. Roquet, J. M. Escoubas, F. Vandenbulcke, O. Levy, L. Saune, P. Bulet and E. Bachere (2007). "Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(45): 17759-64.
- Gruenthal, K. M. and R. S. Burton (2008). "Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis cracherodii* Leach, 1814), a candidate for endangered species status." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **355**(1): 47-58.
- Gueguen, Y., J. P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguere, A. L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachere and J. M. Escoubas (2003). "Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*." Gene **303**: 139-45.
- Gueguen, Y., A. Herpin, A. Aumelas, J. Garnier, J. Fievet, J. M. Escoubas, P. Bulet, M. Gonzalez, C. Lelong, P. Favrel and E. Bachere (2006). "Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression." Journal of Biological Chemistry **281**(1): 313-23.
- Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley (2005). "Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens." Trends in Microbiology **13**(1): 7-10.
- Hamm, D. E. and R. S. Burton (2000). "Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **254**(2): 235-247.
- Handlinger, J., J. Carson, L. Donachie, L. Gabor and D. Taylor (2005). Bacterial Infection in Tasmanian Farmed Abalone: Causes, Pathology, Farm Factors and Control Options. Diseases in Asian Aquaculture P. Walker, R. Lester and M.G. Bondad-Reantaso (Eds). **Fish Health Section**.
- Harries, L. J. and L. Owens (1999). "Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae." Disease Aquatic Organisms **38**: 11-22.
- Harris, L., L. Owens and S. Smith (1996). "A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*." Applied and Environmental Microbiology **62**(9): 3548-50.
- Harvell, C. D., C. E. Mitchell, J. R. Ward, S. Altizer, A. P. Dobson, R. S. Ostfeld and M. D. Samuel (2002). "Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota." Sciences **296**: 2158-2162.
- Hauton, C., L. E. Hawkins and S. Hutchinson (1998). "The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L)." Comparative Biochemistry and Physiology Part B **119**: 619-623.
- Hauton, C., L. E. Hawkins and S. Hutchinson (2000). "The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system." Comparative Biochemistry and Physiology **127**(2): 203-12.
- Hauton, C., L. E. Hawkins and S. Hutchinson (2001). "Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L)." Fish & Shellfish Immunology **11**(2): 143-53.

- Hawkins, L. E., S. Hutchinson, J. D. Brooks and D. Bucke (1993). Differential responses of the three populations of *Ostrea edulis* to environmental stress. Quantified phenotypic responses in morphology and physiology. A. JC. Ashford, JAPAGA: 207-214.
- Hayward, C. J., S. N. Kleeman and R. J. G. Lester (2006). Prevalence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Biciliata: Alveolata: Dinozoa) among wild blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Mollusca) at field site varies annually, and appears to be closely linked to climatic conditions. Fifth International Symposium on Aquatic animal Health. San Francisco, CA USA, Fish Health Section of the American Fisheries Society.
- Hazen, T. H., D. Wu, J. A. Eisen and P. A. Sobecky (2007). "Sequence characterization and comparative analysis of three plasmids isolated from environmental *Vibrio* spp." Applied and Environmental Microbiology **73**(23): 7703-10.
- Hégaret, H., G. H. Wikfors and P. Soudant (2003a). "Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation; I. Haemocyte types and morphology." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **293**: 237-248.
- Hégaret, H., H. G. Wikfors and P. Soudant (2003b). "Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation; II: Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **293**: 249-265.
- Hégaret, H., G. H. Wikfors, P. Soudant, M. Delaporte, J. H. Alix, B. C. Smith, M. S. Dixon, C. Quéré, J. R. Le Coz, C. Paillard, J. Moal and J. F. Samain (2004). "Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation." Aquaculture **234**(1-4): 541-560.
- Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter and C. M. Fraser (2000). "DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*." Nature **406**: 477-483.
- Henke, J. M. and B. L. Bassler (2004). "Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*." Journal of Bacteriology **186**(12): 3794-805.
- Hernandez, G. and J. Olmos (2004). "Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD." Applied microbiology and biotechnology **63**(6): 722-7.
- Higgins, D. A., M. E. Pomianek, C. M. Kraml, R. K. Taylor, M. F. Semmelhack and B. L. Bassler (2007). "The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production." Nature **450**(7171): 883-6.
- Hine, P. M. and B. Wesney (1994). "Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*." Diseases of Aquatic Organisms(20): 219-229.
- Hine, P. M. (1999). "The inter-relationships of bivalves hemocytes." Fish & Shellfish Immunology **9**: 367-385.
- Hine, P. M., S. Wakefield, B. K. Diggles, V. L. Webb and E. W. Maas (2002). "Ultrastructure of a haplosporidian containing Rickettsiae, associated with mortalities among cultured paua *Haliotis iris*." Diseases of Aquatic Organisms **49**(3): 207-19.
- Hobday, A. J., M. J. Tegner and P. L. Haaker (2001). "Over-exploitation of a broadcast spawning marine invertebrate: Decline of the white abalone." Reviews in Fish Biology and Fisheries **10**(4): 493-514.

- Hooper, C., R. Day, R. Slocombe, J. Handler and K. Benkendorff (2007a). "Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models." Fish & Shellfish Immunology **22**(4): 363-79.
- Hooper, C., P. Hardy-Smith and J. Handler (2007b). "Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*)." Australian Veterinary Journal **85**(5): 188-93.
- Hsiao, A., Z. Liu, A. Joelsson and J. Zhu (2006). "*Vibrio cholerae* virulence regulator-coordinated evasion of host immunity." PNAS **103**(39): 14542-7.
- Hsieh, S.-L., Y.-H. Ruan, Y.-C. Li, P.-S. Hsieh, C.-H. Hu and C.-M. Kuo (2008). "Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*." Aquaculture **275**: 335-341.
- Huang, C. Y., P. C. Liu and K. K. Lee (2001). "Withering syndrome of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and associated with thermal induction." Z Naturforsch **56**(9-10): 898-901.
- Huchette, S. M. H. (2003). "Density dependence in the early life-stages of abalone." Thesis of The University of Melbourne: 203.
- Huchette, S. M. H. and J. Clavier (2004). "Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe." Journal of shellfish research **23**(4): 951-55.
- Huchette, S. M. H., C. Paillard, J. Clavier and R. W. Day (2006). "Shell disease: abnormal conchiolin deposit in the abalone *Haliotis tuberculata*." Diseases of Aquatic Organisms **68**: 267-71.
- Humphries, J. E. and T. P. Yoshino (2003). "Cellular Receptors and Signal Transduction in Molluscan Hemocytes: Connections with the Innate Immune System of Vertebrates." Integrative and Comparative Biology **43**: 305-312.
- Humphries, J. E. and T. P. Yoshino (2006). "Schistosoma mansoni excretory-secretory products stimulate a p38 signalling pathway in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells." Int J Parasitol **36**(1): 37-46.
- Humphries, J. E. and T. P. Yoshino (2008). "Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*." Developmental & Comparative Immunology **32**(5): 554-562.
- Huvet, A., A. Herpin, L. Dégremont, Y. Labreuche, J.-F. Samain and C. Cunningham (2004). "The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality." Gene **343**(1): 211-220.
- Iakovleva, N. V., A. M. Gorbushin and K. B. Storey (2006a). "Modulation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) activity in response to different immune stimuli in haemocytes of the common periwinkle *Littorina littorea*." Fish & Shellfish Immunology **21**(3): 315-24.
- Iakovleva NV, Gorbushin AM, Zelck UE (2006b): Partial characterization of mitogen-activated protein kinases (MAPK) from haemocytes of the common periwinkle, *Littorina littorea* (Gastropoda: Prosobranchia). Fish & shellfish immunology **20**:665-8.
- Jamieson, G. S. (1993). "Marine invertebrate fisheries: evaluation of fisheries over-exploitation concerns." Am. Zool. **33**: 551-567.
- Jaques, S. and L. L. McCarter (2006). "Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*." Journal of Bacteriology **188**(7): 2625-35.
- Jenssen, H., P. Hamill and R. E. W. Hancock (2006). "Peptide Antimicrobial Agents." Clinical Microbiology Reviews **19**(3): 491-511.

- Ji, D., W. Song and A. Warren (2004). "Rediscovery and redescription of the marine peritrichous ciliate *Epicarchesium abrae* (Precht, 1935) nov. comb. (Protozoa, Ciliophora, Peritrichia)." European Journal of Protistology **40**(3): 219-224.
- Jiang, Y. and X. Wu (2007). "Characterization of a Rel NF-[kappa]B homologue in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*." Developmental & Comparative Immunology **31**(2): 121-131.
- Johnston, D., N. Moltschaniwskyj and J. Wells (2005). "Development of the radula and digestive system of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*): Potential factors responsible for variable weaning success on artificial diets." Aquaculture **250**(1-2): 341-355.
- Johnston, M. D. and M. H. Brown (2002). "An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing." Journal of Applied Microbiology **92**(6): 1066-77.
- Jolly, C., S. Berland, C. Milet, S. Borzeix, E. Lopez and D. Doumenc (2004). "Zonal Localization of Shell Matrix Proteins in Mantle of *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda)." Marine Biotechnology (NY) **6**: 541-551.
- Jorgensen, D. D., S. K. Ware and J. R. Redmond (1984). "Cardiac output and tissue blood flow in the abalone, *Haliotis cracherodii*." Journal of Experimental Zoology **231**: 309-324.
- Kang, Y. S., Y. M. Kim, K. I. Park, S. Kim Cho, K. S. Choi and M. Cho (2006). "Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*." Developmental & Comparative Immunology.
- Kapfhammer, D., J. Blass, S. Evers and J. Reidl (2002). "*Vibrio cholerae* Phage K139: Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of Related Phages." Journal of Bacteriology **184**(23): 6592-6601.
- Kawamura, T., R. D. Roberts and Y. Yamashita (2001). "Radula development in abalone *Haliotis discus hannai* from larva to adult in relation to feeding transitions." fisheries science **67**(4): 596-605.
- Kim, M. Y., R. Y. Park, M. H. Choi, H. Y. Sun, C. M. Kim, S. Y. Kim, J. H. Rhee and S. H. Shin (2006). "Swarming differentiation of *vibrio vulnificus* downregulates the expression of the vvhBA hemolysin gene via the LuxS quorum-sensing system." Journal of microbiology **44**(2): 226-32.
- Labreuche, Y. (2006). "Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*." Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale.
- Labreuche, Y., P. Soudant, M. Goncalves, C. Lambert and J. L. Nicolas (2006). "Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*." Developmental & Comparative Immunology **30**(4): 367-79.
- Lacoste, A., F. Jalabert, S. K. Malham, A. Cueff and S. A. Poulet (2001). "Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*." Applied and Environmental Microbiology **67**(5): 2304-9.
- Laimek, P., S. Clark, M. Stewart, F. Pfeffer, C. Wanichanon, P. Hanna and P. Sobhon (2008). "The presence of GABA in gastropod mucus and its role in inducing larval settlement." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **354**: 182-191.

- Lambert, C. and J. L. Nicolas (1998). "Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*." Journal of Invertebrate Pathology **71**(1): 53-63.
- Lambert, C., P. Soudant, G. Choquet and C. Paillard (2003). "Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios." Fish and Shellfish Immunology **15**(3): 225-240.
- Lambert, C., P. Soudant, L. Dégremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, F. Jean, A. Huvet and J. F. Samain (2007). "Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites." Aquaculture **270**: 276-288.
- Larsen, M. H., N. Blackburn, J. L. Larsen and J. E. Olsen (2004). "Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*." Microbiology **150**(Pt 5): 1283-90.
- Lavilla-Pitogo, C. R., L. J. Albright, M. G. Paner and N. A. Sunaz (1992). "Studies on the source of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries." Diseases in Asian Aquaculture I: 157-164.
- Lawrence, A. J. and J. M. Soame (2004). "The effects of climate change on the reproduction of coastal invertebrates." Ibis **146**(Suppl.1): 29-39.
- Le Bras, Y., G. Courtois, M. A. Travers, S. Huchette and A. Van Wormhoudt (Submitted). "Coexistence of two subspecies of the abalone *Haliotis tuberculata* along the European coasts: phylogeographic study revealed by mitochondrial marker COI."
- Le Groumellec, M., P. Haffner, B. Martin and C. Martin (1995). Comparative study of bacterial infections responsible for mass mortality in penaeid shrimp hatcheries of the Pacific zone. Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section. M. A. Shariff and J. R. Subasinghe Asian Fisheries Society, Manila: 163-173.
- Lee, C. T., C. Amaro, K. M. Wu, E. Valiente, Y. F. Chang, S. F. Tsai, C. H. Chang and L. I. Hor (2008). "A common virulence plasmid in biotype 2 *Vibrio vulnificus* and its dissemination aided by a conjugal plasmid." Journal of Bacteriology **190**(5): 1638-48.
- Lee, K. K., S. R. Yu and P. C. Liu (1997). "Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*." Current Microbiology **34**(2): 110-7.
- Lee, K. K., Y. L. Chen and P. C. Liu (1999). "Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease." Blood Cells Mol Dis **25**(3-4): 180-92.
- Lee, K. K., P. C. Liu, Y. C. Chen and C. Y. Huang (2001). "The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke." Journal of Thermal Biology **26**: 585-587.
- Lee, K. K., P. C. Liu and W. H. Chuang (2002). "Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish." Marine Biotechnology (NY) **4**(3): 267-77.
- Lee, Y. H. and V. D. Vacquier (1995). "Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca: Gastropoda): Inferences from DNA sequences of sperm lysin." Marine Biology **124**(2): 267-278.
- Lemonnier, H. (2007). "Effet des conditions environnementales sur le développement des pathologies à *Vibrio* dans les élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie." Thèse de doctorat de l'Université de La Rochelle.
- Lencer, W. I. and B. Tsai (2003). "The intracellular voyage of cholera toxin: going retro." Trends in Biochemical Sciences **28**(12): 639-645.
- Lencer, W. I. and D. Saslowsky (2005). "Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1746**(3): 314-321.

- Lester, R. J. G. and C. J. Hayward (2007). Transmission of *Perkinsus olseni*. Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry. A. Villalba. Vigo (Spain), Centro de Investigaciones Mariñas, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, Spain. Centro Tecnológico del Mar - Fundación CETMAR, Vigo, Spain. 2008.
- Li, J., J. Yie, W. Fu, R. W. Foo, Y. Hu, N. Y. Woo and H. Xu (1999). "[Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured *Sparus sarba*]." Wei Sheng Wu Xue Bao **39**(5): 461-8.
- Li, T., M. Ding, J. Zhang, J. Xiang and R. Liu (1998a). "Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast." Journal of Shellfish Research **17**(3): 707-711.
- Li, X., B. Wang and S. F. Liu (1998b). "Studies on pathogen and histopathology of "crack shell disease" of *Haliotis discus hannai*." Journal of Fisheries of China **22**(1): 61-66.(in Chinese).
- Li, Y., J. G. Qin, C. A. Abbott, X. Li and K. Benkendorff (2007). "Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology **293**(6): R2353-62.
- Lilley, B. N. and B. L. Bassler (2000). "Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54." Molecular Microbiology **36**(4): 940-54.
- Lin, W., K. J. Fullner, R. Clayton, J. A. Sexton, M. B. Rogers, K. E. Calia, S. B. Calderwood, C. Fraser and J. J. Mekalanos (1999). "Identification of a vibrio cholerae RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(3): 1071-6.
- Lipp, E. K., A. Huq and R. R. Colwell (2002). "Effects of global climate on infectious disease: the cholera model." Clinical microbiology reviews **15**(4): 757-70.
- Liu, P. C., K. K. Lee and S. N. Chen (1996a). "Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*." Letters in Applied Microbiology **22**(413-416).
- Liu, P. C., K. K. Lee, K. C. Yui, G. H. Kou and S. N. Chen (1996b). "Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*." Current Microbiology **33**(2): 129-32.
- Liu, P. C., K. K. Lee, C. C. Tu and S. N. Chen (1997). "Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*." Current Microbiology **35**(1): 32-9.
- Liu, P. C. and K. K. Lee (1999). "Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*." Letters in Applied Microbiology **28**(6): 428-30.
- Liu, P. C., Y. C. Chen, C. Y. Huang and K. K. Lee (2000). "Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome." Letters in applied Microbiology **31**(6): 433-437.
- Liu, P. C., Y. C. Chen and L. K.K. (2001). "Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*." Microbios **104**(408): 71-77.
- Liu, P. C., W. H. Chuang and K. K. Lee (2003). "Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum." Journal of Applied Ichthyology **19**: 59-61.

- Liu, P. C., J. Y. Lin, W. H. Chuang and K. K. Lee (2004). "Isolation and Characterization of Pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) From the Farmed Marine Cobia Fish *Rachycentron canadum* L. with Gastroenteritis Syndrome." Journal of Microbial Biotechnologies **20**(5): 495-499.
- Leonart, M., J. Handlinger and M. Powell (2003). "Treatment of spionid mud worm (*Boccardia knoxi* Rainer) infestation of cultured abalone." Aquaculture **217**(1-4): 1-10.
- Lopez, C. S. and J. H. Crosa (2007). "Characterization of ferric-anguibactin transport in *Vibrio anguillarum*." Biometals **20**(3-4): 393-403.
- Mah, S., G. Moy, W. Swanson and V. Vacquier (2004). "A perforin-like protein from a marine mollusk." Biochemical and biophysical research communications **316**(2): 468-75.
- Mai, K., J. P. Mercer and J. Donlon (1994). "Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. II: Amino acid composition of abalone and six species of macroalgae with an assessment of their nutritional value." Aquaculture **128**(1-2): 115-130.
- Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori and T. Iida (2003). "Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*." The Lancet **361**(9359): 743-749.
- Malham, S., A. Lacoste, F. Gelebart, A. Cueff and S. Poulet (2003). "Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*." Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology **295**(2): 136-44.
- Manefield, M., L. Harris, S. A. Rice, R. de Nys and S. Kjelleberg (2000). "Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists." Applied and environmental microbiology **66**(5): 2079-84.
- Martello, L. B., C. S. Friedman and R. S. Tjeerdema (2000). "Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on phagocytic and chemotactic function in two species of abalone." Aquatic Toxicology **49**(3): 213-225.
- Martello, L. B. and R. S. Tjeerdema (2001). "Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone." Aquatic Toxicology **51**(3): 351-362.
- Martin, G. G., N. Rubin and E. Swanson (2004). "*Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*." Diseases of Aquatic Organisms **60**(1): 21-9.
- Matozzo, V., L. Da Ros, L. Ballarin, F. Meneghetti and M. G. Marin (2003). "Functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the lagoon of Venice: fishing impact and seasonal variations." Canadian journal of fisheries and aquatic sciences. Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques. **60**: 949-958.
- Matz, C., D. McDougald, A. M. Moreno, P. Y. Yung, F. H. Yildiz and S. Kjelleberg (2005). "Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(46): 16819-24.
- McBride, S. C., E. Rotem, D. Ben Ezra and M. Shipgel (2001). "Seasonal energetics of *Haliotis fulgens* (Philippi) and *Haliotis tuberculata* (L.)." Journal of Shellfish Research **20**(2): 559-665.
- McCarter, L. L. (2001). "Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*." Microbiology and molecular biology reviews **65**(3): 445-62, table of contents.

- McGee, K., P. Horstedt and D. L. Milton (1996). "Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*." Journal of Bacteriology **178**(17): 5188-98.
- McLeod, S. M., H. H. Kimsey, B. M. Davis and M. K. Waldor (2005). CTX and *Vibrio cholerae*: exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. **57**: 347-356.
- McPherson, V. L., J. A. Watts, L. M. Simpson and J. D. Oliver (1991). "Physiological effects of the lipopolysaccharide of *Vibrio vulnificus* on mice and rats." Microbios **67**(272-273): 141-9.
- Mgaya, Y. D., E. M. Gosling, J. P. Mercer and J. Donlon (1995). "Genetic variation at three polymorphic loci in wild and hatchery stocks of the abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus." Aquaculture **136**(1-2): 71-80.
- Miller, E. S., J. F. Heidelberg, J. A. Eisen, W. C. Nelson, A. S. Durkin, A. Ciecko, T. V. Feldblyum, O. White, I. T. Paulsen, W. C. Nierman, J. Lee, B. Szczypinski and C. M. Fraser (2003). "Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage." Journal of Bacteriology **185**(17): 5220-33.
- Miller, M. B., K. Skorupski, D. H. Lenz, R. K. Taylor and B. L. Bassler (2002). "Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*." Cell **110**(3): 303-14.
- Miller, S. D., S. H. Haddock, C. D. Elvidge and T. F. Lee (2005). "Detection of a bioluminescent milky sea from space." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(40): 14181-4.
- Mitta, G., F. Vandenbulcke, F. Hubert, M. Salzet and P. Roch (2000a). "Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense." Journal of Biological Chemistry **275**(17): 12954-62.
- Mitta, G., F. Vandenbulcke and P. Roch (2000b). "Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity." FEBS Lett **486**(3): 185-90.
- Mok, K. C., N. S. Wingreen and B. L. Bassler (2003). "*Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression." Embo Journal **22**(4): 870-81.
- Molina-Aja, A., A. Garcia-Gasca, A. Abreu-Grobois, C. Bolan-Mejia, A. Roque and B. Gomez-Gil (2002). "Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp." FEMS Microbiology Letters **213**(1): 7-12.
- Montagnani, C., J. C. Avarre, J. de Lorgeril, M. Quiquand, V. Boulo and J. M. Escoubas (2007). "First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway." Developmental and Comparative Immunology **31**(1): 1-11.
- Montero, A. B. and B. Austin (1999). "Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonnie)." Journal of Fish Diseases **22**: 377-386.
- Montfort, D. (1810). Conchyologie systématique 2.
- Montgomery, M. T. and D. L. Kirchman (1993). "Role of chitin-binding protein in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin." Applied and environmental microbiology **59**: 373-379
- Moore, J. D., G. N. Cherr and C. S. Friedman (2001a). "Detection of 'Candidatus Xenohaliotis californiensis' (Rickettsiales-like prokaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome." Diseases of Aquatic Organisms **46**(2): 147-52.

- Moore, J. D., T. T. Robbins, R. P. Hedrick and C. S. Friedman (2001b). "Transmission of the Rickettsiales-like prokaryote *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and its role in Withering Syndrome of California abalone." Journal of Shellfish Research **20**: 867-874.
- Morse, D. E., N. Hooker, H. Duncan and L. Jensen (1979). "Gamma-Aminobutyric Acid, a Neurotransmitter, Induces Planktonic Abalone Larvae to Settle and Begin Metamorphosis." Science **204**(4391): 407-410.
- Mouton, A. (2000). "Health management and disease surveillance in abalone, *Haliotis midiae*." Journal of Shellfish Research **19**: 526.
- Munro, J., J. Oakey, E. Bromage and L. Owens (2003). "Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*." Diseases of Aquatic Organisms **54**(3): 187-94.
- Myers, R. and B. Worm (2003). "Rapid worldwide depletion of predatory fish communities." Nature **423**: 280-283.
- Nakatsugawa, T., T. Nagai, K. Hiya, T. Nishizawa and K. Muroga (1999). "A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophia." Diseases of Aquatic Organisms **36**(2): 159-161.
- Nakayama, T. and N. Nomura (2005). "Analysis of the relationship between luminescence and toxicity of *Vibrio carchariae* pathogenic to shrimp." Fisheries sciences **71**: 1236-42.
- Nakayama, T., E. Ito, N. Nomura and M. Matsumura (2006a). "Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance." FEMS Microbiology Letters **258**(2): 194-9.
- Nakayama, T., N. Nomura and M. Matsumura (2006b). "Study on the relationship of protease production and luminescence in *Vibrio harveyi*." Journal of Applied Microbiology **101**(1): 200-5.
- Nasu, H., T. Iida, T. Sugahara, Y. Yamaichi, K. S. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa and T. Honda (2000). "A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains." J Clin Microbiol **38**(6): 2156-61.
- Newton, K., R. Peters and D. Raftos (2004). "Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*)." Developmental & Comparative Immunology **28**(6): 565-569.
- Nicolas, J. L., O. Basuyaux, J. Mazurie and A. Thebault (2002). "*Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*." Diseases of Aquatic Organisms **50**(1): 35-43.
- Nishibuchi, M. and J. B. Kaper (1990). "Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*." Molecular Microbiology **4**(1): 87-99.
- Nishimori, E., O. Hasegawa, T. Numata and Wakabayashi. (1998). "*Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*." Fish Pathology **33**: 495-502.
- Nyholm, S. V., E. Passegue, W. B. Ludington, A. Voskoboynik, K. Mitchel, I. L. Weissman and A. W. De Tomaso (2006). "fester, A candidate allorecognition receptor from a primitive chordate." Immunity **25**(1): 163-73.
- O'Toole, R., S. Lundberg, S. A. Fredriksson, A. Jansson, B. Nilsson and H. Wolf-Watz (1999). "The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components." Journal of Bacteriology **181**(14): 4308-17.

- O'Toole, R., J. Von Hofsten, R. Rosqvist, P. E. Olsson and H. Wolf-Watz (2004). "Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*." Microbial Pathogenesis **37**(1): 41-6.
- Oakes, F. R. and R. C. Fields (1996). "Infestation of *Haliotis rufescens* shells by a sabellid polychaete." Aquaculture **140**(1-2): 139-143.
- Oakey, H. J. and L. Owens (2000). "A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia." Journal of Applied Microbiology **89**(4): 702-9.
- Oakey, H. J., B. R. Cullen and L. Owens (2002). "The complete nucleotide sequence of the *Vibrio harveyi* bacteriophage VHML." Journal of Applied Microbiology **93**(6): 1089-98.
- Okada, K., T. Iida, K. Kita-Tsukamoto and T. Honda (2005). "Vibrios commonly possess two chromosomes." Journal of Bacteriology **187**(2): 752-7.
- Olafsen, J. A., T. C. Fletcher and P. T. Grant (1992). "Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge." Developmental and Comparative Immunology **16**(2-3): 123-38.
- Olafsen, J. A. (1995). "Role of lectins (C-reactive protein) in defense of marine bivalves against bacteria." Advances in experimental medicine and biology **371A**: 343-8.
- Oliver, J. L., T. D. Lewis, M. Faisal and S. L. Kaattari (1999). "Analysis of the effects of *Perkinsus marinus* proteases on plasma proteins of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)." Journal of Invertebrate Pathology **74**(2): 173-83.
- Ono, T., K. S. Park, M. Ueta, T. Iida and T. Honda (2006). "Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1." Infection and immunity **74**(2): 1032-42.
- Ordas, M. C., B. Novoa and A. Figueras (1999). "Phagocytosis inhibition of clam and mussel haemocytes by *Perkinsus atlanticus* secretion products." Fish and Shellfish Immunology **9**: 491-503.
- Ordas, M. C., A. Ordas, C. Beloso and A. Figueras (2000). "Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*." Fish Shellfish Immunol **10**(7): 597-609.
- Otsu, R. and K. Sasaki (1997). "Virus-like particles detected from juvenile abalones (*Nordotis discus discus*) reared with an epizootic fatal wasting disease." Journal of Invertebrate Pathology **70**: 167-168.
- Ottaviani, E., L. R. Paeman, P. Cadet and G. B. Stefano (1993). "Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes." European Journal of Pharmacology **248**(4): 319-24.
- Oubella, R., P. Maes, C. Paillard and M. Auffret (1993). "Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia)." Diseases of Aquatic Organisms **15**: 193-197.
- Oubella, R., C. Paillard, P. Maes and M. Auffret (1994). "Changes in hemolymph parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge." Journal of Invertebrate Pathology **64**(1): 33-38.
- Oubella, R., P. Maes, B. Allam, C. Paillard and M. Auffret (1996). "Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria)." Aquatic Living Resources **9**: 137-143.
- Owens, L., D. A. Austin and B. Austin (1996). "Effect of siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates." Diseases of Aquatic Organisms **27**: 157-160.
- Paillard, C., P. Maes and R. Oubella (1994). "Brown Ring Disease in Clams." Annual Review of Fish Diseases **4**: 219-240.

- Paillard, C. and P. Maes (1995a). "The Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina." Journal of Invertebrate Pathology **65**(2): 91-100.
- Paillard, C. and P. Maes (1995b). "The Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II. Microscopic study of the brown ring syndrome." Journal of Invertebrate Pathology **65**(2): 101-110.
- Paillard, C., B. Allam and R. Oubella (2004a). "Effect of temperature on defense parameters in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with *Vibrio tapetis*." Diseases of Aquatic Organisms **59**(3): 249-262.
- Paillard, C., F. Leroux and J. J. Borrego (2004b). "Bacterial Disease in marine Bivalves : Review of recent studies. Trends and evolution." Aquatic Living Ressources. **17**: 477-498.
- Pallen, M. J. and N. J. Matzke (2006). "From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella." Nature Reviews in Microbiology **4**(10): 784-90.
- Pang, L., X. H. Zhang, Y. Zhong, J. Chen, Y. Li and B. Austin (2006). "Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene." Letters in Applied Microbiology **43**(3): 249-55.
- Paranjpye, R. N. and M. S. Strom (2005). "A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence." Infection and immunity **73**(3): 1411-22.
- Paranjpye, R. N., A. B. Johnson, A. E. Baxter and M. S. Strom (2007). "Role of type IV pilins in persistence of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virginica* oysters." Applied and environmental microbiology **73**(15): 5041-4.
- Park, K. S., T. Ono, M. Rokuda, M. H. Jang, K. Okada, T. Iida and T. Honda (2004). "Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*." Infection and immunity **72**(11): 6659-65.
- Pasharawipas, T., S. Thaikua, S. Sriurairatana, L. Ruangpan, S. Direkbusarakum, J. Manopvisetcharean and T. W. Flegel (2005). "Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand." Virus Research **114**(1-2): 63-9.
- Pasharawipas, T., N. Wetchakit and S. Sriurairatana (2008). "The cycle for a Siphoviridae-like phage (VHS1) of *Vibrio harveyi* is dependent on the physiological state of the host." Virus Research In Press, Corrected Proof.
- Pass, D. A., R. Dybdahl and M. M. Mannion (1987). "Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in western Australia." Aquaculture **65**: 149-169.
- Payne, M., J. Oakey and L. Owens (2004). "The ability of two different *Vibrio* spp. bacteriophages to infect *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*." Journal of Applied Microbiology **97**(4): 663-72.
- Peters, R. and D. A. Raftospeters (2003). "The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*)." Aquaculture **223**: 29-39.
- Pizzutto, M. and R. G. Hirst (1995). "Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent strains to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting." Diseases of Aquatic Organisms **21**: 61-68.
- Powers, L. G., J. T. Mallonee and P. A. Sobecky (2000). "Complete nucleotide sequence of a cryptic plasmid from the marine bacterium *Vibrio splendidus* and identification of open reading frames." Plasmid **43**(1): 99-102.

- Prado-Alvarez, M., C. Gestal, B. Novoa and A. Figueras (2008). "Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*." Fish & Shellfish Immunology **In Press, Accepted Manuscript**.
- Przeslawski, R., A. R. Davis and K. Benkendorff (2005). "Synergistic effects associated with climate change and the development of rocky shore molluscs." Global Change Biology **11**: 515–522.
- Puiprom, O. (2003). "Characterization of a bacteriophage VHS1 that increases the virulence of *Vibrio harveyi* to shrimp." Thesis of the Mahidol Univesity.
- Pushpamali, W. A., M. De Zoysa, H.-S. Kang, C. H. Oh, I. Whang, S. J. Kim and J. Lee (2008). "Comparative study of two thioredoxin peroxidases from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Cloning, recombinant protein purification, characterization of antioxidant activities and expression analysis." Fish & Shellfish Immunology **24**(3): 294-307.
- Radashevsky, V. I. and C. Olivares (2005). "*Polydora uncinata* (Polychaeta: Spionidae) in Chile: an accidental transportation across the Pacific." **7**: 489–496.
- Raghunath, P., I. Karunasagar and I. Karunasagar (2007). "Evaluation of an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe for detection and enumeration of vibrio spp. from shrimp hatchery environment." Molecular and Cellular Probes **21**(4): 312-5.
- Rajesh Kumar, S., V. P. Ishaq Ahamed, M. Sarathi, A. Nazeer Basha and A. S. Sahul Hameed (2008). "Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV)." Fish & Shellfish Immunology **24**(4): 467-78.
- Ramos, H. C., M. Rumbo and J.-C. Sirard (2004). "Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa." Trends in Microbiology **12**(11): 509-517.
- Rasch, M., C. Buch, B. Austin, W. J. Slierendrecht, K. S. Ekmann, J. L. Larsen, C. Johansen, K. Riedel, L. Eberl, M. Givskov and L. Gram (2004). "An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by Vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)." Systematics and Applied Microbiology **27**(3): 350-9.
- Reen, F. J., S. Almagro-Moreno, D. Ussery and E. F. Boyd (2006). "The genomic code: inferring *Vibrionaceae* niche specialization." Nature Reviews in Microbiology **4**(9): 697-704.
- Reidl, J. and K. E. Klose (2002). "*Vibrio cholerae* and cholera : out of the water and into the host." FEMS Microbiology Reviews **741**: 1-15.
- Reynaud, Y., D. Saulnier, D. Mazel, C. Goarant and F. Le Roux (2008). "Correlation between detection of a plasmid and high-level virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*." Applied and environmental microbiology **74**(10): 3038-47.
- Roch, P. (1999). "Defense mechanism and disease prevention in farmed marine invertebrates." Aquaculture **172**: 125-145.
- Rosenberg, E. and L. Falkovitz (2004). "The *Vibrio shiloi*/Oculina patagonica model system of coral bleaching." Annual Reviews in Microbiology **58**: 143-59.
- Rosenberg, E., O. Koren, L. Reshef, R. Efrony and I. Zilber-Rosenberg (2007). "The role of microorganisms in coral health, disease and evolution." Nature Reviews Microbiology **5**(5): 355-62.
- Rosenblum, E. S., T. T. Robbins, B. B. Scott, S. Nelson, C. Juhasz, A. Craigmill, R. S. Tjeerdema, J. D. Moore and C. S. Friedman (2008). "Efficacy, tissue distribution, and residue depletion of oxytetracycline in WS-RLP infected California red abalone *Haliotis rufescens*." Aquaculture **277**(3-4): 138-148.

- Rowley, A. F. and A. Powell (2007). "Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?" Journal of Immunology **179**(11): 7209-14.
- Rubin, E. J., W. Lin, J. J. Mekalanos and M. K. Waldor (1998). "Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage." Mol Microbiol **28**(6): 1247-54.
- Ruby, E. G., M. Urbanowski, J. Campbell, A. Dunn, M. Faini, R. Gunsalus, P. Lostroh, C. Lupp, J. McCann, D. Millikan, A. Schaefer, E. Stabb, A. Stevens, K. Visick, C. Whistler and E. P. Greenberg (2005). Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. PNAS **102**: 3004-3009.
- Sack, D. A., R. B. Sack, G. B. Nair and A. K. Siddique (2004). "Cholera." Lancet **363**(9404): 223-33.
- Sadd, B. M. and P. Schmid-Hempel (2006). "Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure." Current Biology **16**(12): 1206-10.
- Sahaphong, S., V. Linthong, S. Apisawetakan, C. Wanichanon, S. Riengrojpitak, V. Viyanant, S. E. Upatham, N. Kangwanransan, T. Pumthong and P. Sobhon (2001). "Morphofunctional study of the hemocytes of *Haliotis asinina*." Journal of Shellfish Research **20**(2): 711-716.
- Samain, J. F. and H. McCombie (2007). Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : Défi Morest.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy and D. Ansquer (2000). "Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review." Aquaculture **191**(1-3): 133-144.
- Saulnier, D. (2007). Development of diagnostic tools for the detection of *Vibrio* species and pathogenic strains associated with mortalities of cultured pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. Vibrio 2007, Paris, France.
- Sawabe, T., I. Sugimura, M. Ohtsuka, K. Nakano, K. Tajima, Y. Ezura and R. Christen (1998). "*Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*." International Journal of Systematic Bacteriology **48**(Pt 2): 573-80.
- Sawabe, T., F. Thompson, J. Heyrman, M. Cnockaert, K. Hayashi, R. Tanaka, M. Yoshimizu, B. Hoste, J. Swings and Y. Ezura (2002). "Fluorescent amplified fragment length polymorphism and repetitive extragenic palindrome-PCR fingerprinting reveal host-specific genetic diversity of *Vibrio halioticoli*-like strains isolated from the gut of Japanese abalone." Applied and environmental microbiology **68**(8): 4140-4144.
- Sawabe, T., N. Setoguchi, S. Inoue, R. Tanaka, M. Ootsubo, M. Yoshimizu and Y. Ezura (2003). "Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. halioticoli* association." Aquaculture **219**: 671-679.
- Sawabe, T., Y. Fukui and E. V. Stabb (2006). "Simple conjugation and outgrowth procedures for tagging vibrios with GFP, and factors affecting the stable expression of the gfp tag." Letters in Applied Microbiology **43**(5): 514-22.
- Sawabe, T., S. Inoue, Y. Fukui, K. Yoshie, Y. Nishihara and Y. Miura (2007). "Mass mortalities of Japanese abalone *Haliotis diversicolor supertexta* caused by *Vibrio harveyi* infection." Microbes and Environment **22**(3): 300-308.
- Selvamani, M. J. P., S. M. Degnan, D. Paetkau and B. M. Degnan (2000). "Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for the tropical abalone, *Haliotis asinina*." Journal of Shellfish Research **19**(1): 532.
- Seo, J. K., J. M. Crawford, K. L. Stone and E. J. Noga (2005). "Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*." Biochemical and biophysical research communications **338**(4): 1998-2004.

- Shime-Hattori, A., T. Iida, M. Arita, K. S. Park, T. Kodama and T. Honda (2006). "Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation." FEMS Microbiology Letters **264**(1): 89-97.
- Shivu, M. M., B. C. Rajeeva, S. K. Girisha, I. Karunasagar, G. Krohne and I. Karunasagar (2007). "Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India." Environmental Microbiology **9**(2): 322-31.
- Shuhong, W., W. Yilei, Z. Zhaoxia, R. Jack, W. Zhaohong, Z. Zhihua and Z. Ziping (2004). "Response of innate immune factors in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* to pathogenic or non pathogenic infection." Journal of Shellfish Research **23**(4): 1173-77.
- Simpson, L. M. and J. D. Oliver (1983). "Siderophore production by *Vibrio vulnificus*." Infection and immunity **41**(2): 644-9.
- Sithigorngul, P., S. Rukpratanporn, N. Pecharaburanin, P. Suksawat, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and W. Sithigorngul (2007). "A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*." Journal of Microbiological Methods **71**(3): 256-64.
- Sobecky, P.A., Mincer, T.J., Chang, M.C., Toukdarian, A. and Helinski, D.R. "Isolation of broad-host-range replicons from marine sediment bacteria" Applied and Environmental Microbiology **64** (8), 2822-2830 (1998)
- Sobhon, P., S. Apisawetakana, M. Chanpooa, C. Wanichanona, V. Linthonga, A. Thongkukiatkulc, P. Jarayabhandd, M. Kruatrachueb, S. Upathamc and P. Poomthonge (1999). "Classification of Germ Cells, Reproductive Cycle and Maturation of Gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus." Science Asia **25** 3-21.
- Soderhall, K., L. Cerenius and M. W. Johansson (1994). "The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence." Annals of the New York Academy of Sciences **712**: 155-61.
- Soffientino, B., T. Gwaltney, D. R. Nelson, J. L. Specker, M. Mauel and M. Gomez-Chiarri (1999). "Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture." Diseases of Aquatic Organisms **38**: 201-210.
- Soletchnik, P., D. Razet, P. Geairon, N. Faury and P. Gouletquer (1997). Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): Metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages, EDP Sciences.
- Soto-Rodriguez, S. A., A. Roque, M. L. Lizarraga-Partida, A. L. Guerra-Flores and B. Gomez-Gill (2003). "Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii." Diseases of Aquatic Organisms **53**(3): 231-40.
- Soudant, P., C. Paillard, G. Choquet, C. Lambert, H. I. Reid, A. Marhic, L. Donaghy and H. T. Birkbeck (2004). "Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis (=Tapes, =Ruditapes) philippinarum*." Aquaculture **229**: 401-418.
- Sparks, A. K. and J. F. Morado (1988). Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. Bethesda, MD, American Fisheries Society.
- Stork, M., M. Di Lorenzo, S. Mourino, C. R. Osorio, M. L. Lemos and J. H. Crosa (2004). "Two tonB systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence." Infection and immunity **72**(12): 7326-9.
- Strom, M. S. and R. N. Paranjpye (2000). "Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*." Microbes Infect **2**(2): 177-88.

- Su, Y. C. and C. Liu (2007). "*Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety." Food Microbiology **24**(6): 549-58.
- Suginta, W., P. A. Robertson, B. Austin, S. C. Fry and L. A. Fothergill-Gilmore (2000). "Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*." Journal of Applied Microbiology **89**(1): 76-84.
- Suginta, W., A. Vongsuwan, C. Songsiriritthigul, H. Prinz, P. Estibeiro, R. R. Duncan, J. Svasti and L. A. Fothergill-Gilmore (2004). "An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis." Archives of biochemistry and biophysics **424**(2): 171-80.
- Suja, C. P. and S. Dharmaraj (2005). "In vitro culture of mantle tissue of the abalone *Haliotis varia* Linnaeus." Tissue Cell **37**(1): 1-10.
- Svitol, A. L., S. Chadhain, J. A. Moore and D. L. Kirchman (1997). "Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Forms of Chitin." Applied and environmental microbiology **63**(2): 408-413.
- Svitol, A. L. and D. L. Kirchman (1998). "A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4-beta-glycanases." Microbiology **144** (Pt 5): 1299-308.
- Swanson, W. J., C. F. Aquadro and V. D. Vacquier (2001). "Polymorphism in abalone fertilization proteins is consistent with the neutral evolution of the egg's receptor for lysin (VERL) and positive Darwinian selection of sperm lysin." Molecular Biology & Evolution **18**(3): 376-383.
- Takahashi, H., Y. Hara-Kudo, J. Miyasaka, S. Kumagai and H. Konuma (2005). "Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus*." Journal of Microbiological Methods **61**(1): 77-85.
- Tall, B. D., J. F. La Peyre, J. W. Bier, M. D. Miliotis, D. E. Hanes, M. H. Kothary, D. B. Shah and M. Faisal (1999). "*Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes." Applied and environmental microbiology **65**(9): 4261-3.
- Tam, V. C., D. Serruto, M. Dziejman, W. Briehner and J. J. Mekalanos (2007). "A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization." Cell Host Microbe **1**(2): 95-107.
- Tan, J., M. Lancaster, A. Hyatt, R. van Driel, F. Wong and S. Warner (2008). "Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy." Journal of Virological Methods **149**(2): 338-341.
- Tanaka, R., T. Sawabe, K. Tajima, J. Vandenberghe and Y. Ezura (2001). "colony hybridization, identification, non-radioisotope labeling, *Vibrio halioticoli*." fisheries science **67**.
- Tanaka, R., M. Ootsubo, T. Sawabe, K. Tajima, J. Vandenberghe and Y. Ezura (2002). "Identification of *Vibrio halioticoli* by colony hybridization with non-radioisotope labeled genomic DNA probe." fisheries science **68**: 227-229.
- Tanaka, R., I. Sugimura, T. Sawabe, M. Yoshimizu and Y. Ezura (2003). "Gut microflora of abalone *Haliotis discus hannai* in culture changes coincident with a change in diet." fisheries science **69**: 951-958.
- Tang, S., A. Popongviwat, S. Klinbunga, A. Tassanakajon, P. Jarayabhand and P. Menasveta (2005). "Genetic heterogeneity of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) revealed by RAPD and microsatellite analyses." Journal of biochemistry, molecular biology, and biophysics : **38**(2): 182-90.

- Tanguy, A., X. Guo and S. E. Ford (2004). "Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters." Gene **338**(1): 121-31.
- Tantillo, G. M., M. Fontanarosa, A. Di Pinto and M. Musti (2004). "Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections." Letters in Applied Microbiology **39**(2): 117-26.
- Teo, J. W., A. Suwanto and C. L. Poh (2000). "Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*." Antimicrobial agents and chemotherapy **44**(5): 1309-14.
- Teo, J. W., L. H. Zhang and C. L. Poh (2003). "Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6." Gene **303**: 147-56.
- Thompson, F. L., T. Iida and J. Swings (2004). "Biodiversity of vibrios." Microbiology and molecular biology reviews **68**(3): 403-31.
- Thompson, F. L., B. Gomez-Gil, A. T. Vasconcelos and T. Sawabe (2007). "Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species." Applied and environmental microbiology **73**(13): 4279-85.
- Tirape, A., C. Bacque, R. Brizard, F. Vandenbulcke and V. Boulo (2007). "Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis." Developmental and Comparative Immunology.
- Tiscar, P. G. and F. Mosca (2004). "Defense mechanisms in farmed marine molluscs." Veterinary research communications **28 Suppl 1**: 57-62.
- Travers, M. A., P. M. Da Silva, N. Le Goïc, D. Marie, A. Donval, S. M. H. Huchette, M. Koken and C. Paillard (2008). "Morphologic, cytometric and functional characterization of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes." Fish & Shellfish Immunology **24**(4): 400-411.
- Trucksis, M., J. Michalski, Y. K. Deng and J. B. Kaper (1998). "The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(24): 14464-9.
- Tu, K. C. and B. L. Bassler (2007). Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Genes and Development **21**: 221-233.
- Tunkijjanukij, S., H. V. Mikkelsen and J. A. Olafsen (1997). "A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph." Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology **117**(2): 273-86.
- Uttakleiv Ræder, I. L., S. M. Paulsen, A. O. Smalås and N. P. Willassen (2007). "Effect of fish skin mucus on the soluble proteome of *Vibrio salmonicida* analysed by 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry." Microbial Pathogenesis **42**(1): 36-45.
- Valiente, E., C. T. Lee, L. I. Hor, B. Fouz and C. Amaro (2008a). "Role of the metalloprotease Vvp and the virulence plasmid pR99 of *Vibrio vulnificus* serovar E in surface colonization and fish virulence." Environmental Microbiology **10**(2): 328-38.
- Valiente, E., C. T. Lee, J. Lamas, L. Hor and C. Amaro (2008b). "Role of the virulence plasmid pR99 and the metalloprotease Vvp in resistance of *Vibrio vulnificus* serovar E to eel innate immunity." Fish & Shellfish Immunology **24**(1): 134-141.
- Vasta, G. R., H. Ahmed, N. E. Fink, M. T. Elola, A. G. Marsh, A. Snowden and E. W. Odom (1994). "Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution." Annals of the New York Academy of Sciences **712**: 55-73.
- Vasta, G. R. and H. Ahmed (1996). "Animal lectins as cell surface receptors: current status for invertebrate species." Progress in molecular and subcellular biology **17**: 158-82.

- Vattanaviboon, P. and S. Mongkolsuk (2001). "Unusual adaptive, cross protection responses and growth phase resistance against peroxide killing in a bacterial shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*." FEMS Microbiology Letters **200**(1): 111-6.
- Vattanaviboon, P., W. Panmanee and S. Mongkolsuk (2003). "Induction of peroxide and superoxide protective enzymes and physiological cross-protection against peroxide killing by a superoxide generator in *Vibrio harveyi*." FEMS Microbiology Letters **221**(1): 89-95.
- Vidgen, M., J. Carson, M. Higgins and L. Owens (2006). "Changes to the phenotypic profile of *Vibrio harveyi* when infected with the *Vibrio harveyi* myovirus-like (VHML) bacteriophage." Journal of Applied Microbiology **100**(3): 481-7.
- Vilchis, L. I., M. J. Tegner, J. D. Moore, C. S. Friedman, K. L. Riser, T. T. Robbins and P. K. Dayton (2005). "Ocean warming effects on growth, reproduction and survivorship of southern california abalone." Ecological applications **15**(2): 469-480.
- Waechter, M., F. Le Roux, J.-L. Nicolas, E. Marissal and F. Berthe (2002). "Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*." Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III Biologie **325**(3): 231-238.
- Wagner, P. L. and M. K. Waldor (2002). Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. Infection and Immunity **70**: 3985-3993.
- Waldor, M. K. and D. RayChaudhuri (2000). "Bacterial genomics: Treasure trove for cholera research." Nature **406**(6795): 469-470.
- Wang, G.-D., K.-F. Zhang, Z.-P. Zhang, Z.-H. Zou, X.-W. Jia, S.-H. Wang, P. Lin and Y.-L. Wang (2008a). "Molecular cloning and responsive expression of macrophage expressed gene from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*." Fish & Shellfish Immunology **24**(3): 346-359.
- Wang, K.-J., H.-L. Ren, D.-D. Xu, L. Cai and M. Yang (2008b). "Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria." Developmental & Comparative Immunology **In Press, Uncorrected Proof**.
- Wang, N., I. Whang and J. Lee (2008c). "A novel C-type lectin from abalone, *Haliotis discus discus*, agglutinates *Vibrio alginolyticus*." Developmental & Comparative Immunology **32**(9): 1034-1040.
- Wang, Q., Q. Liu, Y. Ma, H. Rui and Y. Zhang (2007). "LuxO controls extracellular protease, haemolytic activities and siderophore production in fish pathogen *Vibrio alginolyticus*." Journal of Applied Microbiology **103**(5): 1525-34.
- Wang, T., X. Li, K. Bott, L. Song, S. Clarke and W. Zhao (2006). "Effects on water temperature on the lysosomal membrane stability in hemocytes of blacklip abalone, *Haliotis rubra*." Journal of Shellfish Research **25**(3): 935-940.
- Ward, J. R., K. L. Rypien, J. F. Bruno, C. D. Harvell, E. Jordan-Dahlgren, K. M. Mullen, R. E. Rodriguez-Martinez, J. Sanchez and G. Smith (2006). "Coral diversity and disease in Mexico." Diseases of Aquatic Organisms **69**(1): 23-31.
- Warner, E. and J. D. Oliver (2007). "Refined medium for direct isolation of *Vibrio vulnificus* from oyster tissue and seawater." Applied and environmental microbiology **73**(9): 3098-100.
- Waters, C. M. and B. L. Bassler (2006). "The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers." Genes and Development **20**(19): 2754-67.
- Watson, F. L., R. Puttmann-Holgado, F. Thomas, D. L. Lamar, M. Hughes, M. Kondo, V. I. Rebel and D. Schmucker (2005). "Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects." Science **309**(5742): 1874-8.

- Witteveldt, J., J. M. Vlak and M. C. van Hulten (2006). "Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28." Diseases of Aquatic Organisms **70**(1-2): 167-70.
- Wright, A. C., L. M. Simpson, J. D. Oliver and J. G. Morris, Jr. (1990). "Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*." Infection and immunity **58**(6): 1769-73.
- Wright, A. C., J. L. Powell, M. K. Tanner, L. A. Ensor, A. B. Karpas, J. G. Morris, Jr. and M. B. Sztein (1999). "Differential expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide." Infection and immunity **67**(5): 2250-7.
- Wu, H. Z., H. Z. Zhang, C. X. Lu, N. Liang, H. Y. Jin, Y. Ma and Y. X. Zhang (2003). "DNA sequencing of a plasmid with virulence from marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*." Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) **35**(10): 956-9.
- Xavier, K. B. and B. L. Bassler (2005). "Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication." Nature **437**(7059): 750-3.
- Xu, Q., M. Dziejman and J. J. Mekalanos (2003). Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. PNAS **100**: 1286-1291.
- Yakovleva, N. V., M. P. Samoilovich and A. M. Gorbushin (2001). "The diversity of strategies of defense from pathogens in molluscs." Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology **37**(4): 358-367.
- Yamamoto, S., N. Okujo, Y. Fujita, M. Saito, T. Yoshida and S. Shinoda (1993). "Structures of two polyamine-containing catecholate siderophores from *Vibrio fluvialis*." Journal of Biochemistry **113**(5): 538-44.
- Yamamoto, S., N. Okujo, S. Matsuura, I. Fujiwara, Y. Fujita and S. Shinoda (1994). "Siderophore-mediated utilization of iron bound to transferrin by *Vibrio parahaemolyticus*." Microbiology and Immunology **38**(9): 687-93.
- Ye, J., Y. Ma, Q. Liu, D. L. Zhao, Q. Y. Wang and Y. X. Zhang (2008). "Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system." J Fish Dis **31**(3): 161-9.
- Yoneda, C., M. N. Ahsan, M. Nakaya, Y. Matsubara, T. Ebihara, S. Irie, Y. Uno, K. Hatae and S. Watabe (2000). "Abalone collagens: immunological properties and seasonal changes of their mRNA levels." Comparative Biochemistry and Physiology, B **126**(1): 59-68.
- Zelck, U. E., B. E. Gege and S. Schmid (2007). "Specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase and PI3-K pathways impair immune responses by hemocytes of trematode intermediate host snails." Developmental & Comparative Immunology **31**(4): 321-331.
- Zhang, S. M., C. M. Adema, T. B. Kepler and E. S. Loker (2004). "Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate." Science **305**(5681): 251-4.
- Zhang, X. H. and B. Austin (2000). "Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids." Journal of Fish Diseases **23**: 93-102.
- Zuniga, G., S. A. G. Del Proo, R. Cisneros and G. Rodriguez (2000). "Population genetic analysis of the abalone *Haliotis fulgens* (Mollusca: Gastropoda) in Baja California, Mexico." Journal of Shellfish Research **19**(2): 853-859.