

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**Mortalité de masse et infection bactérienne chez les bivalves:
liens avec la physiologie larvaire et l'environnement bactérien
chez deux espèces d'huîtres commerciales**

Thèse présentée

dans le cadre du programme de doctorat en Océanographie

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

PAR

Bertrand Genard

Novembre 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Composition du jury :

Céline Audet, présidente du jury, Université du Québec à Rimouski (Canada)

Réjean Tremblay, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski (Canada)

**Fabrice Pernet, codirecteur de recherche, Institut français de recherche pour
l'exploitation de la mer, Sète (France)**

**Karine Lemarchand, codirectrice de recherche, Université du Québec à Rimouski
(Canada)**

**Ilie Racotta, examinateur externe, Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste
(Mexique)**

Dépôt initial le 10 février 2011

Dépôt final le 4 novembre 2011

À mes parents, ma
douce et mon petit ange.

REMERCIEMENTS

En guise de préambule à cette thèse, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail ainsi qu'à l'accomplissement de cette aventure qu'est le doctorat.

Je tiens à remercier Réjean Tremblay, qui, en tant que directeur de ma thèse, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de ma thèse, sans qui ce doctorat n'aurait jamais vu le jour. Il a été pour moi une source d'inspiration, d'aide et de motivation quand j'en avais le plus besoin.

Mes remerciements s'adressent également à mes deux codirecteurs Fabrice Pernet et Karine Lemarchand qui m'ont suivi tout au long de cette thèse. Je remercie M. Pernet d'une part, pour m'avoir accueilli dans ses laboratoires de l'IRZC où j'ai pu réaliser ma première expérience et d'autre part, pour ses conseils et suggestions scientifiques qui m'ont beaucoup appris sur le métier de chercheur. Je remercie Mme Lemarchand qui en plus de m'avoir initié à ce monde particulier qu'est la microbiologie, a été pour moi d'un soutien et d'une aide inestimables dans les moments les plus difficiles de ma thèse.

Je tiens à remercier spécialement Céline Audet et Ilie Racotta pour avoir pris le temps d'évaluer mon travail en tant que présidente du jury pour Mme Audet et en tant que membre externe pour M. Racotta. Merci pour vos précieux commentaires et suggestions.

Ma reconnaissance va également aux chercheurs Pierre Boudry, Jean-Louis Nicolas et Dario Moraga qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et qui ont été d'une aide précieuse dans l'élaboration des expériences et lors de la rédaction de mes articles.

J'exprime également ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de mes expériences, sans qui tout le travail d'écloserie et de laboratoire n'aurait pu être réalisé. Je pense particulièrement aux équipes de l'ISMER (Iften, JB, Nathalie, Phil, et Rémy) de l'IRZC (Chantal, Claude et Josée), de l'IFREMER (Philippe, Claudie, Mathieu, Jeanne, Arnaud, Elodie et Afi) et de l'IUEM (Élise, Isabelle, Arnaud, Esterine et Leila).

Mes remerciements vont également à mes parents pour leurs encouragements, leur soutien et leur patience. Je pense particulièrement à ma Maman qui malheureusement n'aura pas vu l'aboutissement de ce travail mais qui je suis sûr, serait tellement fière de moi. Merci à toi aussi Papa pour toutes ces belles discussions que nous avons eues sur mes recherches et qui m'ont redonné la motivation à continuer.

Je ne remercierai jamais assez ma moitié, Catherine, pour m'avoir soutenu, épaulé et surtout supporté pendant la réalisation de ce doctorat. Merci pour ta patience et ton amour. J'ai une pensée toute particulière pour notre petite Gaëlle qui a vécu la fin de cette thèse dans ton ventre et qui nous apporte tellement de bonheur maintenant au quotidien.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de cette thèse. Merci à tous et à toutes.

RÉSUMÉ

L'émergence de la mortalité est un phénomène récurrent en écloserie de bivalves. Celle-ci est le plus associée à une modification des conditions de cultures des larves qui favorise la prolifération de bactéries opportunistes. L'impact de ces bactéries sur la physiologie larvaire est encore mal connu. C'est pourquoi dans ce projet, nous avons décidé de documenter les relations qui peuvent exister entre la physiologie larvaire, l'environnement bactérien et l'apparition de la mortalité chez deux espèces d'huîtres, *Crassostrea virginica* et *C. gigas*. Pour cela, la thèse a été axée autour de deux expériences principales où les larves ont été mises en culture dans des environnements bactériens différents. La première expérience avait pour objectif de suivre le développement de larves d'huîtres américaines (*C. virginica*) cultivées en présence ou non d'un antibiotique non sélectif. L'antibiotique a été utilisé dans cette expérience pour pouvoir générer des environnements bactériens différents, l'un où la charge et la prolifération bactérienne est limitée par le traitement à l'antibiotique, et l'autre où les bactéries peuvent se développer sans contraintes. Dans la deuxième expérience, l'environnement bactérien des larves d'huîtres du Pacifique (*C. gigas*) a été modifié par l'ajout ou non d'un pathogène connu dans les bassins de culture (challenge bactérien). Dans les deux expériences, la physiologie larvaire a été abordée par l'étude du contenu en lipides, du métabolisme, du stress oxydatif et de l'immunité, grâce à une approche multidisciplinaire comprenant des analyses enzymologiques, biochimiques et moléculaires. De plus, afin d'avoir une vision globale de la qualité de l'élevage, ces analyses ont été complétées par des mesures des taux de survie, de croissance et des niveaux d'alimentation. Des analyses microbiologiques ont également été effectuées pour caractériser l'environnement bactérien des larves. Les résultats obtenus pour ces deux expériences, nous ont permis de caractériser des changements physiologiques associés d'une part à la dégradation des conditions de culture des larves et à l'apparition d'une mortalité de masse (première expérience), et d'autre part, à une exposition à un pathogène (deuxième expérience). Dans les deux situations, nous avons pu mettre en évidence que

l'apparition de la mortalité était associée à (1) une baisse de l'activité alimentaire, (2) un niveau métabolique plus faible, (3) la consommation des réserves énergétiques, (4) une modification de la composition en acides gras des lipides polaires, (5) un stress cellulaire plus important, (6) l'activation des défenses antioxydantes et des mécanismes de cytoprotection, et (7) à l'activation de la réponse immunitaire. De par son caractère intégratif, cette étude a permis d'avoir une vision plus large des changements physiologiques associés à l'apparition de la mortalité en éclosion d'huîtres, ce qui ouvre la voie à de futures études qui auront pour objectifs de mieux comprendre l'impact physiologique des pathologies chez les larves de bivalves.

Mots clés : *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, mortalité, larves, microbiologie, physiologie, génomique, métabolisme, lipides, stress, immunité.

ABSTRACT

The emergence of mortality is a recurrent event in bivalve hatchery, often linked to the modification in the culture environment of larvae in link to proliferation of opportunistic bacteria. The impact of these bacteria on larval physiology is weakly understood. We investigated the relationships between larval physiology, bacterial environment and the occurrence of mortality in two oyster species, *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. This thesis was realised around two main experiments where larvae were reared in different bacterial environments. The objective of the first experiment was to follow the larval development of American oysters reared in presence or not of non-selective antibiotic. Antibiotic was used to generate different environments, one where the bacterial load and the opportunistic proliferation were restricted by the antibiotic treatment, and another where bacteria could develop without restriction. In the second experiment, the bacterial environment of larvae was modified by addition or not of know pathogens for oyster larvae. In both experiments, larval physiology was investigated by the multidisciplinary study of the lipids content, the metabolism, the oxidative stress and the immunity, with the use of enzyme, biochemical and molecular analyses. Moreover, to have an overall vision of larval culture, these analyses were supplemented by the measurements of survival rates, growth and feeding activity. Microbiological analyses were also performed to characterize the bacterial environment of larvae. The results acquired in this project, allowed us to understand the changes in physiology of oyster larvae in contact to bacterial environmental changes associated to mass mortality (first experience) or directly during exposition to pathogen bacteria (second experience). In both situations, the appearance of mortality was associated to (1) a feeding activity decline, (2) a weaker metabolic level, (3) the consumption of energy reserves, (4) changes in fatty acids profiles of the polar lipids, (5) a higher oxidative stress, (6) the activation of antioxidant defenses and cytoprotection, and (7) in the activation of immune response. The integrative approach

of this study provides an overview of the physiological mechanisms of oyster larvae related to pathogen and mass mortality.

Keywords : *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, mortality, larvae, microbiology, physiology, genomic, metabolism, lipids, oxidative stress, immunity.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	IX
RÉSUMÉ.....	XI
ABSTRACT	XIII
TABLE DES MATIÈRES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XXI
LISTE DES FIGURES	XXIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	XXVII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PROBLEMATIQUE ET PRESENTATION DU PROJET DE THESE.....	1
BIOLOGIE DES ESPECES	4
Généralités.....	4
Cycle de vie.....	5
COMMUNAUTE BACTERIENNE, CULTURE LARVAIRE ET MORTALITE.....	9
LES LIPIDES.....	14
Les triglycérides.....	15
Les lipides membranaires.....	15
Les acides gras.....	17
Lipides et développement larvaire	23
METABOLISME ENERGETIQUE	27
Métabolisme énergétique et développement larvaire.....	30
IMMUNITE CHEZ LES BIVALVES.....	31
Immunité cellulaire.....	32
Prolifération cellulaire.....	32
Reconnaissance du soi	34
Les protéines de liaison aux LPS.....	35

Les lectines.....	36
Le system pro-PO.....	37
Les polypeptides antimicrobiens.....	37
La poussée oxydative ou « oxydative burst ».....	38
Les enzymes hydrolytiques.....	40
Les protéases et inhibiteurs de protéases	41
STRESS OXYDATIF ET DEFENSES ANTIOXYDANTES	43
Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	43
Les sources de ROS.....	43
Implication du stress oxydatif sur l'organisme	44
Les systèmes antioxydants.....	45
Les superoxydes dismutases (SOD).....	45
La catalase (CAT)	46
Les glutathion peroxydases (GPX)	46
Les peroxyrédoxines (PRDX).....	47
Le système antioxydant non-enzymatique	48
Les protéines de stress	49
OBJECTIFS DE LA THESE.....	49
Expérience 1:	51
Expérience 2:	51
CHAPITRE 1	53
CHANGEMENTS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES ASSOCIES À L'APPARITION D'UNE MORTALITE DE MASSE CHEZ DES LARVES D'HUITRE AMERICAINE <i>CRASSOSTREA VIRGINICA</i>	53
RESUME	54
PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES ASSOCIATED WITH MASSIVE MORTALITY EVENTS OCCURRING IN LARVAE OF AMERICAN OYSTER (<i>CRASSOSTREA VIRGINICA</i>)	55
Abstract.....	56

Introduction	57
Materials and methods	59
Rearing procedures	59
Experimental design	59
Larval performance.....	60
Lipid class and fatty acid analyses.....	60
Bacterial analyses	61
Spectrophotometric analyses	62
Statistical analyses	63
Results	64
Survival, growth and feeding activity.....	64
Bacterial analyses	64
Protein and lipid class contents.....	67
Fatty acid composition.....	68
Enzyme activities and lipid peroxidation	71
Discussion	77
Characterization of the massive mortality	77
Development and performance of oyster larvae.....	80
Conclusion	82
Acknowledgments	82
Literature cited	82
CHAPITRE 2	91
ETUDE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DE GENES CANDIDATS POUR CARACTERISER LE METABOLISME, L'IMMUNITE ET LE STRESS CELLULAIRE PENDANT L'EMERGENCE D'UNE MORTALITE DE MASSE CHEZ DES LARVES D'HUITRE AMERICAINE <i>CRASSOSTREA VIRGINICA</i>.....	91
RESUME	92

EXPRESSION OF CANDIDATE GENES RELATED TO METABOLISM, IMMUNITY AND CELLULAR STRESS DURING PREMETAMORPHIC MASSIVE MORTALITY IN THE AMERICAN OYSTER <i>CRASSOSTREA VIRGINICA</i> IN RELATION TO BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS	93
Abstract	94
Introduction	95
Materials and methods	96
Experimental design and physiological characterization of the mortality event	96
RNA extraction	97
Real-time PCR	97
Studied genes	98
Statistical analysis	101
Results	101
Relative gene expression between treatments	101
Temporal changes of transcript abundance	103
Discussion	105
Mortality emergence and variation of gene expression	105
Genes related to metabolism	106
Cellular stress and immunity	109
Conclusion	113
Acknowledgments	113
References cited	113
CHAPITRE 3	125
VUE DU PHYSIOLOGIQUE AU MOLECULAIRE DES CHANGEMENTS ASSOCIES A UNE EXPOSITION A COURT TERME A UN PATHOGENE BACTERIEN CHEZ DES LARVES DE <i>C. GIGAS</i>	125
RESUME	126

MOLECULAR TO PHYSIOLOGICAL CHANGES ASSOCIATED TO SHORT-TERM BACTERIAL PATHOGEN EXPOSURE IN <i>C. GIGAS</i> LARVAE	127
Abstract	128
Introduction.....	129
Methods	131
Rearing procedures	131
Experimental design	132
Larval performance.....	132
Lipid class and fatty acid analyses.....	133
Spectrophotometric analyses	134
RNA extraction and real-time PCR	135
Microbiological analyses	138
RT PCR-DGGE	138
Flow cytometry	139
Statistical analyses	140
Results.....	141
Larval performance.....	141
Bacterial community analysis.....	141
Redundancy analysis	143
Challenge effect	144
Temporal changes	146
Discussion	149
Bacterial challenge.....	149
Energy metabolism	150
Structural lipids.....	151
Cellular stress.....	155
Immunity.....	157
Conclusion	160
Acknowledgments	161

Bibliographic references.....	161
Electronic supplementary materials.....	181
S1. DGGE gels, BLAST results, and sequencing	181
S2. Response variables: means and statistics.....	184
CONCLUSION.....	189
PRINCIPAUX RESULTATS ET CONTRIBUTION DE L'ETUDE.....	189
COMPARAISON DES GROUPES CONTROLES ET DEVELOPPEMENT ONTOGENIQUE.....	199
PERSPECTIVES.....	200
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Évolution des principaux organes de <i>C. virginica</i> entre les stades prodissoconche II et juvéniles (modifié de Elston, 1999).....	9
Tableau 1.2. Liste des bactéries pathogènes chez les larves de bivalves (modifié de Paillard <i>et al.</i> , 2004).	12
Tableau 1.3. Nom usuel et systématique des acides gras les plus courants.	18
Table 2.1. Fatty acid composition (mass %) of polar lipids in American oyster <i>Crassostrea virginica</i> as a function of development time and seawater treatment.	70
Table 2.2. Summary of linear regressions between enzymes involved in energy metabolism and antioxidant activities (activity per larva) in American oyster <i>Crassostrea virginica</i> (n = 9).	74
Table 2.3. Summary of linear regressions between enzyme activities (activity per larva) and malondialdehyde (MDA, content per larva) concentration in American oyster <i>Crassostrea virginica</i> (n = 9)	76
Table 3.1. Details of genes and primers used in the quantitative real-time PCR relative expression analysis.....	100
Table 4.1. Details of genes and primers used in the quantitative real-time PCR relative expression analysis.....	137
Table 4.2. BLAST results for retrieved band B1.	182
Table 4.3. BLAST results for retrieved band B2.	183
Table 4.4. Summary of data (Mean \pm STD) for larval performance and energetic metabolism.	184

Table 4.5. Summary of data (Mean \pm STD) for neutral lipids.	185
Table 4.6. Summary of data (Mean \pm STD) for polar lipids.	186
Table 4.7. Summary of data (Mean \pm STD) for lipids-related genes.	187
Table 4.7. Summary of data (Mean \pm STD) for parameters associated to immunity and cellular stress.	188

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Cycle de vie de l’huître creuse.....	6
Figure 1.2. Préparation histologique d’une larve de <i>C.virginica</i> au stade de développement véligère (prodissonche II).	8
Figure 1.3. Structure des triglycérides	15
Figure 1.4. Structure des classes des phospholipides (extrait de Voet et Voet, 1998).....	16
Figure 1.5. Illustration des nomenclatures des acides gras (extrait de Berge et Barnathan, 2005)	18
Figure 1.6. Voie d’élargissement et de désaturation des acides gras chez les algues marines (extrait de Bergé et Barnathan, 2005)	21
Figure 1.7. Voie de biosynthèse du 22:2 Δ 7,13 (NMIi) et 22:2 Δ 7,15 (NMIj) (extrait de Barnathan 2009).	22
Figure 1.8. Voies de synthèse des eicosanoïdes.....	25
Figure 1.9. Vue générale du métabolisme énergétique (extrait de www.nature.com/scitable)	27
Figure 1.10. Schéma des quatre étapes de la β -oxydation	29
Figure 1.11. Voie de signalisation Rel/NF- κ B dans un hémocyte de <i>C. gigas</i>	34
Figure 1.12. Représentation des processus de dégradation intracellulaire intervenant après phagocytose d’une particule étrangère par les hémocytes.	39
Figure 2.1. Survival, shell length and clearance rate for American oyster <i>Crassostrea virginica</i> larvae as a function of development time and seawater treatment.	66

Figure 2.2. Mass of protein in American oyster <i>Crassostrea virginica</i> as a function of development time and seawater treatment.....	67
Figure 2.3. Lipid class composition of American oyster <i>Crassostrea virginica</i> as a function of development time and seawater treatment.	69
Figure 2.4. Metabolism energy activity of American oyster <i>Crassostrea virginica</i> as a function of development time and seawater treatment.....	72
Figure 2.5. Antioxidant enzyme activities of American oyster <i>Crassostrea virginica</i> as a function of development time and seawater treatment.....	73
Figure 2.6. Lipid peroxidation levels as measured by malondialdehyde (MDA) in American oyster <i>Crassostrea virginica</i> as a function of development time and seawater treatment.	75
Figure 3.1. Ct values of selected housekeeping genes in <i>Crassostrea virginica</i> larvae as a function of development time and seawater treatment.	99
Figure 3.2. Relative expression of selected genes in <i>Crassostrea virginica</i> larvae untreated with antibiotic.....	102
Figure 3.3. Evolution of transcript abundance in <i>Crassostrea virginica</i> larvae as a function of development time in seawater treated with an antibiotic.	104
Figure 3.4. Evolution of transcript abundance in <i>Crassostrea virginica</i> larvae as a function of development time in seawater untreated with an antibiotic, where a massive mortality was observed at 20 dpf.....	105
Figure 4.1. Mortality and clearance rate for Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> larvae as a function of experiment duration and bacterial challenge.	142
Figure 4.2. Significant temporal changes of the bacterial load in carboys independently of bacterial challenge.	143

Figure 4.3. RDA ordination biplot representing the significant ($p<0.05$) challenge effect after 24 (Chal24) and 48h (Chal48) as explanatory variables (arrows) on selected response variables (lines) related to energy metabolism, lipids, cellular stress, and immunity.	146
Figure 4.4. RDA ordination biplot representing the significant ($p<0.05$) experimental time effect on challenged (Time Chal) and unchallenged (Time Unchal) larvae as explanatory variables (arrows) on selected response variables (lines) related to energy metabolism, lipids, cellular stress, and immunity.	148
Figure 4.5. DGGE gels performed with 16s cDNA extracted from larvae (L) and surrounding water (W).	181
Figure 4.6. Alignment of <i>Vibrio corallilyticus</i> 16s sequences.	182
Figure 5.1. Schéma récapitulatif des changements associés à une infection bactérienne. .	190

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

A(R)A	Acide arachidonique ou acide eicosatétraénoïque
AA15LX	Arachidonate 15-lipoxygenase
ACS	Acyl-CoA synthetase
ADH	Acyl-CoA dehydrogenase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGL	a-agglutinin attachment subunit
ANX6	Annexin 6
ARN	Acide ribonucléique
AS6	ATP synthase f0 subunit 6
ATP	Adénosine Triphosphate
CAT	Catalase
CC1	Cytochrome c 1
CCO	Cytochrome oxydase
CCO<i>i</i>	Cytochrome c oxidase subunit i
cLEC	c-type lectin-1
CS	Cytrate synthase
CTB	Cathepsins B
CYT P450	Cytochrome P450
Defh2	Defensin 2
Delta 5	Stearoyl-desaturase 5
Delta 6	Fatty acid desaturase 2
Delta 9	Delta 9 desaturase
D9-des	Delta 9 desaturase
DHA	Acide decohexanoïque

DPA	Acide decosapentaénoïque
ECH	Enoyl-hydratase isomerase family protein
ECSIT	Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways
ecSOD	Superoxide dismutase extracellular
EDL	Endothelial lipase
eIF-2b	elongation factor 2b
EPA	Acide eicosapentaénoïque
EST	Expresses Sequence Tag
Gal8	Galectin 8
GPX	Glutathione peroxydase
GR	Glutathione réductase
GS	Glutamine synthetase
HSP	Heat shock protein
IκB	Inhibitor of NF-κB
KC-rec	Killer cell receptor
LBP/BPI	LPS binding proteins/ bactericidal-permeability-increasing protein
Lipstor	Adipolipin
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen activated protein kinase kinase 1
MDA	malondialdéhyde
MDH	Malate déshydrogénase
MT	Metallothionein
MYC-h	MYC-homolog
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NADHox	Mitochondrial nadh:ubiquinone oxidoreductase

NF-kB	Nuclear Factor- kB
NK-rec	Natural killer receptor
oIKK	Oyster Ikb kinase-like protein
PCR	Polymerase Chain reaction
PCR-DGGE	PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis
Pctrans	phosphatidylcholine transferase
PK	Pyruvate kinase
PLA2	Phospholipase a2 receptor 1
PLD1	Phospholipase delta 1
PRDX	Peroxiredoxin
PRN	Pernine
Psdec	Phosphatidylserine decarboxylase
RDA	redundance analysis
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SOD	Superoxyde dismutase
SUP	RAS suppressor
TCBS	Thiosulfate citrate bile sucrose agar
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TIR	Toll-Interleukin-1 récepteur
TLR	Toll-like récepteur
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF-receptor associated factor

INTRODUCTION GÉNÉRALE

PROBLÉMATIQUE ET PRÉSENTATION DU PROJET DE THÈSE

La culture des mollusques et de l'huître en particulier, contribue au développement socio-économique de plusieurs régions côtières. L'augmentation de la production de bivalves pour la consommation humaine implique un développement constant des techniques de production larvaire en éclosérie. Une des contraintes significatives qui influencent le succès de la production larvaire chez les bivalves est l'apparition sporadique de fortes mortalités dans les bassins d'élevage. Celles-ci sont le plus souvent associées à la prolifération de pathogènes opportunistes. Bien que la taxonomie des pathogènes et l'impact histologique des infections soient bien documentés pour les stades larvaires (Paillard *et al.*, 2004), peu d'informations sont disponibles sur les changements physiologiques encourus par les larves lors d'infections bactériennes. C'est pourquoi une meilleure compréhension des relations qui existent entre la physiologie larvaire, les communautés bactériennes et l'apparition des mortalités s'avère un outil important pour la compréhension des processus physiologiques associés aux infections bactériennes en éclosérie. Ce projet de thèse a été monté dans l'optique d'améliorer ces connaissances chez deux espèces d'huîtres commerciales : *Crassostrea virginica* et *C. gigas*. Pour cela, nous avons décidé, au travers de deux expériences, de caractériser l'impact d'une modification de l'environnement bactérien sur la physiologie larvaire, et ce grâce à une approche multidisciplinaire incluant des analyses enzymologiques, biochimiques et génomiques, axée sur quatre axes principaux de recherche : la dynamique lipidique, le métabolisme, l'immunité et le stress oxydatif.

Les caractéristiques lipidiques (grandes classes et acides gras) sont certainement un des paramètres biochimiques le plus utilisés pour caractériser le développement larvaire chez les bivalves. Cela s'explique par le fait que les lipides neutres, essentiellement les triglycérides, constituent la principale réserve énergétique des larves et fournissent la

majeure partie de l'énergie nécessaire à l'embryogenèse et à la métamorphose (García-Esquivel *et al.*, 2001; Pernet *et al.*, 2006b). C'est pourquoi le succès du développement larvaire chez les bivalves dépend de l'acquisition de réserves en triglycérides suffisantes (García-Esquivel *et al.*, 2001; Pernet *et al.*, 2006b). Les acides gras jouent un rôle important dans le développement des larves chez les bivalves. Des études ont montré que certains acides gras polyinsaturés de la famille des oméga 3 et 6 sont essentiels à la croissance et à la survie des larves et des juvéniles (Delaunay *et al.*, 1992; Coutteau *et al.*, 1994; Soudant *et al.*, 1998; Nevejan *et al.*, 2003a, b; Pernet et Tremblay, 2004; Pernet *et al.*, 2005; Rico-Villa *et al.*, 2006). Le succès de la métamorphose est aussi influencé par le contenu en acides gras polyinsaturés des larves, particulièrement l'acide docohexanoïque ou DHA (Delaunay *et al.*, 1993; Pernet *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que chez certains invertébrés, l'acide arachidonique (AA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA), deux acides gras polyinsaturés, peuvent être extraits des membranes cellulaires pour être utilisés dans la synthèse de composés impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire : les eicosanoïdes (Howard et Stanley, 1999; Stanley et Miller, 2006; Stanley *et al.*, 2009). Bien que cette voie de régulation n'a pas été définitivement démontrée chez les bivalves, Delaporte *et al.* (2006) ont montré l'importance d'une alimentation riche en AA sur les paramètres immunitaires de *C. gigas*. Pour leur développement, les larves vont puiser l'énergie nécessaire dans leurs réserves (triglycérides, protéines et hydrates de carbone), impliquant *in fine* l'activation de complexes enzymatiques du cycle de Krebs et de la chaîne de transport d'électrons pour la synthèse d'ATP. De ce fait, l'analyse des niveaux d'activité de ces enzymes s'avère un outil intéressant pour caractériser l'activité métabolique des larves. Aux stades larvaires chez les bivalves, des approches enzymologiques du métabolisme énergétique ont déjà été utilisées pour caractériser la demande énergétique pendant le développement (García-Esquivel *et al.*, 2001; Moran et Manahan, 2003) où en fonction de la disponibilité alimentaire (García-Esquivel *et al.*, 2002; Moran et Manahan, 2004; Meyer *et al.*, 2007). Dans un contexte d'infection bactérienne, peu d'informations sont disponibles concernant l'impact des pathogènes sur l'activité métabolique des larves. Seuls les travaux de Flye-Sainte-Marie *et al.* (2007) ont évalué l'impact de la maladie de

l'anneau brun sur le budget énergétique mais sur des juvéniles de palourde (*Ruditapes philippinarum*) et non sur des larves.

Pour faire face à une infection bactérienne, les bivalves possèdent essentiellement des mécanismes de défenses immunitaires innés regroupés en processus cellulaires et humoraux. L'immunité cellulaire comprend toutes les cellules immunitaires impliquées dans l'évacuation des corps étrangers par phagocytose, nodulation ou encapsulation. L'immunité humorale reprend tous les processus acellulaires impliqués dans la reconnaissance du « non-soi », dans l'activation des cellules immunitaires, dans les mécanismes phagocytaires et dans la production de composés antimicrobiens qui permettent l'élimination des corps étrangers. Ces différentes composantes de l'immunité chez les huîtres adultes sont bien documentées (Gestal *et al.*, 2008), mais peu d'informations sont disponibles pour les stades larvaires. Le développement des approches moléculaires a permis l'établissement de banques de gènes (Jenny *et al.*, 2007; Quilang *et al.*, 2007; Tanguy *et al.*, 2008; Fleury *et al.*, 2009) qui offrent de nouvelles perspectives pour l'étude du système immunitaire dans les premiers stades de vie chez les bivalves (Tirape *et al.*, 2007).

Lors d'une infection, les larves subissent plusieurs types de stress dont l'origine peut être exogène, c'est-à-dire liée à l'activité du pathogène (production de toxines et d'enzymes de dégradation), ou endogène quand l'induction du stress est associée à l'activité de la larve. Au niveau cellulaire, une source potentielle de stress est la production d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour Reactive Oxygen Species) lors de la phagocytose des corps étrangers (Canesi *et al.*, 2002). Chez les bivalves, la production de ROS lors de la réponse immunitaire a été mise en évidence chez plusieurs espèces (Anderson *et al.*, 1992; Bramble et Anderson, 1997; Lambert et Nicolas, 1998; Lambert *et al.*, 2003; Labreuche *et al.*, 2006). Bien que nécessaire à l'élimination des corps étrangers, ces ROS peuvent s'avérer nocifs pour l'organisme (peroxydation des lipides, dénaturation des protéines et dommage à l'ADN) s'ils ne sont pas bien gérés. Face à ce stress oxydatif, les cellules possèdent deux catégories de défenses antioxydantes : les systèmes

antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Chez l'huître du pacifique, plusieurs études ont suggéré l'importance de ces défenses antioxydantes dans la résistance de certains individus au stade adulte face au phénomène de mortalité estivale (Lambert *et al.*, 2007; Samain *et al.*, 2007). Bien que plus fréquemment utilisée dans un contexte écotoxicologique (Manduzio *et al.*, 2005), l'étude des défenses antioxydantes peut s'avérer un outil intéressant pour caractériser l'activation de la réponse immunitaire.

Les connaissances actuelles ainsi que les aspects théoriques nécessaires à la réalisation de ce projet de thèse sont présentés dans les sections suivantes. Nous commencerons par une brève description de la biologie des espèces étudiées, viendront ensuite les parties traitant des communautés bactériennes et de leurs implications pour la culture larvaire, la dynamique des lipides, le métabolisme énergétique, l'immunité et le stress oxydatif.

BIOLOGIE DES ESPÈCES

Généralités

L'huître américaine, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) et l'huître du pacifique, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) appartiennent au phylum des mollusques, à la classe des bivalves, à l'ordre des *Ostreoida* et à la famille des *Ostreidae*. Ce sont des espèces sessiles (fixées au substrat), tolérantes aux variations de température (eurythermes) et de salinité (euryhalines). Les deux espèces se retrouvent dans les régions peu profondes des zones tidales et subtidales (entre 0,5-75 mètres) où le substrat est consolidé (amoncellement de galets, fonds rocheux, coquilles d'huîtres de générations plus anciennes). On les considère comme des espèces filtreuses suspensivores épibenthiques, se nourrissant principalement de petit phytoplancton, de zooplancton, de bactéries et de petites particules détritiques.

Crassostrea virginica est native de la côte Est du continent nord américain. On la trouve du golfe du St-Laurent (Canada) au golfe du Mexique (États-Unis et Mexique) et

elle est l'espèce d'huître la plus cultivée en Amérique du Nord. Elle contribue au développement économique de plusieurs régions côtières du Mexique (Veracruz, Tabasco, Tamaulipas), des États-Unis (Chesapeake Bay) et du Canada (Sud du golfe du Saint-Laurent). L'huître du pacifique, *C. gigas*, aussi appelée huître creuse, est originaire du Japon et de la péninsule coréenne. Elle fut introduite avec succès en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Europe et dans l'Ouest canadien et américain. C'est l'espèce aquatique la plus cultivée dans le monde. En France, elle a été importée en 1967 pour pallier la disparition de l'huître portugaise *C. angulata*.

Cycle de vie

L'huître américaine et l'huître du pacifique sont deux espèces dioïques (sexes séparés) possédant une sexualité alternante. Les adultes changent de sexe au cours de leur vie, avec une tendance à la protandrie c'est à dire avec un premier cycle de reproduction en tant que mâle. Leur cycle sexuel commence par la gamétogenèse induite par l'augmentation de la température de l'eau. La fécondation est externe et a lieu dans l'eau après l'émission des gamètes mâles et femelles en dehors de la coquille. La ponte se produit généralement au printemps lorsque la température de l'eau dépasse les 20°C. Cette température limite varie selon l'origine géographique des populations d'huîtres. Les périodes de ponte vont du mois de mars au mois de novembre. La ponte peut avoir lieu artificiellement en laboratoire ou en écloserie par choc thermique ou par stimulation hormonale. Une femelle libère des millions d'œufs qui deviennent globuleux lorsqu'ils sont fécondés. Après la fécondation, les huîtres vont développer successivement deux modes de vie (figure 1.1). Des premiers stades larvaires jusqu'à la métamorphose, les larves développent un mode de vie planctonique, c'est-à-dire qu'elles vivent et se nourrissent essentiellement dans la colonne d'eau (pélagique). Après la métamorphose, les larves ont quitté la colonne d'eau pour le fond océanique où elles se sont fixées (mode de vie benthique).

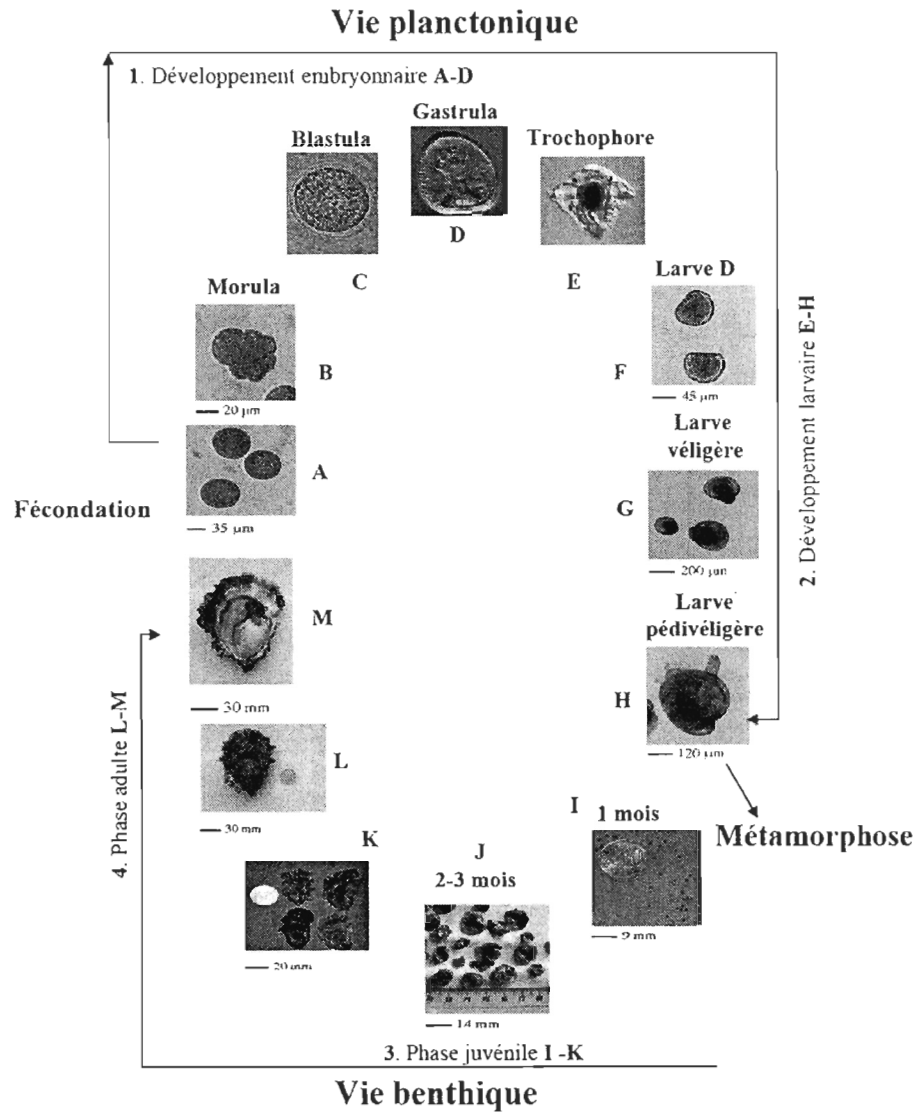


Figure 1.1. Cycle de vie de l'huître creuse. A Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes. B-Embryon stade morula (2 heures). C-Embryon stade blastula (3heures). D-Embryon stade gastrula (6 heures). E-Larve trochophore (12 heures). F-Larves D (24heures). G-Larves véligères (14 jours). H-Larve pédivéligère (18 jours). I-Naissains post-fixation (1mois). J-Naissains (2 mois). K-Naissains (6 mois). L-Adulte (10 mois). M- Géniteur mature (10 mois). Nb : l'âge indiqué pour les photos (jours ou mois) est représentatif d'huîtres élevées en nurserie et en claire ostréicole. (Extrait de Tirape, 2007).

Le stade zygote est très court et le développement larvaire commence rapidement après la fécondation. En quelques heures, une larve trochopore est formée signifiant le

début du stade veligère et du mode de vie pélagique. Après 24 heures, deux valves fines sont formées et après 48 heures, une coquille entoure complètement le corps et les organes élémentaires sont formés. À ce stade, on parle de larve D. Ensuite, le développement se poursuit et la larve prend une forme arrondie proche de celle de l'adulte (larve véligère ou prodissonche II). La coquille contient peu de carbonate de calcium. Cela la rend moins dense et transparente, permettant une observation microscopique des organes internes. La masse viscérale est constituée de deux composantes principales : le velum et la cavité cœlomique contenant les organes viscéraux (figure 1.2). Le velum consiste en un anneau cilié impliqué à la fois dans l'alimentation et dans la nage. La membrane du velum est en contact avec celle de la cavité cœlomique et de la bouche. Ses mouvements sont assurés par les muscles vélaires. La cavité cœlomique consiste en un sac rempli de fluide physiologique contenant principalement le système digestif, un pied en développement et les muscles adducteurs postérieurs et antérieurs. Le système digestif est composé de la bouche, de l'œsophage, de la glande digestive et de l'intestin (Kennedy *et al.*, 1996, Elston, 1999).

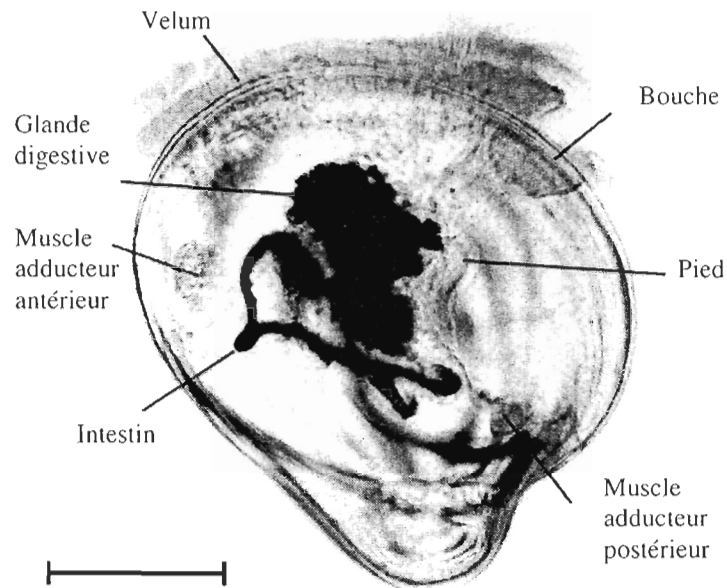


Figure 1.2. Préparation histologique d'une larve de *C. virginica* au stade de développement véligère (prodissonche II). La barre est égale à 100 μm (d'après Elston, 1999)

Après une vingtaine de jours, les larves véligères développent une tache appelée « œil » sur chaque coquille, un pied proéminent, une glande byssale et des branchies rudimentaires. Tous ces changements marquent le début du stage pédivéligère et annoncent la métamorphose. Durant cette période, qui peut durer quelques heures à quelques jours, les larves vont se diriger vers le substrat à la recherche d'un site de fixation. Le pied va leur permettre de se déplacer à la recherche d'un substrat adéquat et de s'y enfouir. Une fois celui-ci trouvé, les larves s'y fixent grâce à la glande byssale, quittant de ce fait leur vie pélagique (fin de la période planctonique) pour commencer leur cycle benthique. À ce stade, on parlera de larves dissoconches. La période de fixation coïncide avec la métamorphose au cours de laquelle les larves vont acquérir progressivement leur morphologie d'adulte. Pendant la métamorphose les larves subissent des changements profonds qui sont caractérisés par la résorption des certains organes larvaires, la différenciation d'organes déjà présents aux stades larvaires et une réorganisation tissulaire (tableau 1.1). Une fois la métamorphose terminée, les huîtres sont dites « juvéniles ».

Celles-ci consacreront une grande partie de leur énergie à la croissance pour atteindre leur taille adulte et leur maturité sexuelle après quelques mois ou années selon les régions et l'espèce.

Tableau 1.1. Évolution des principaux organes de *C. virginica* entre les stades prodissoconche II et juvéniles (modifié de Elston, 1999).

Organes	Prodissoconche II	Métamorphose	Juvéniles
Muscles adducteur	Deux muscles adducteurs de masse égale	Muscle adducteur postérieur et réorientation	Muscle adducteur postérieur
Muscles vélaire	Muscles vélaire multiples	Résorption	-
Velum	Velum bien développé	Résorption	-
Pied	Pied bien développé au stade pédivéligère	Résorption	-
Système digestif	Estomac, sac stylaire et glande digestive (intestins)	Réorientation des organes	Développement des lobes de la glande digestive et de l'estomac et élongation du sac stylaire
Système circulatoire, branchies et système excréteur	Système circulatoire ouvert (cavité coelomique) non développé, branchies et reins rudimentaires	Réorientation des organes, cœur et reins rudimentaires et cavité coelomique ouverte	Fin du développement cœur, reins et branchies, fermeture progressive de la cavité coelomique
Manteau	Manteau développé en trois lobes au stade pédivéligère	augmentation de la surface du manteau	Développement de la musculature et des tentacules.

COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE, CULTURE LARVAIRE ET MORTALITÉ

Que ce soit pour la culture des larves d'invertébrés ou de vertébrés, les bactéries s'imposent comme une des variables les plus difficiles à contrôler en éclosion (Olafsen, 2001; Paillard *et al.*, 2004). Bien que nécessaire au bon développement des larves (Crosby *et al.* 1990; Douillet, 1993a,b), les bactéries peuvent s'avérer nocives et engendrer de fortes mortalités. L'émergence de ces fortes mortalités affecte tous les stades ontogéniques et est le plus souvent liée au développement d'un ou de plusieurs pathogènes d'origine bactérienne, virale ou fongique (voir tableau 1.2 pour une synthèse des bactéries pathogènes connues pour les stades larvaires chez les bivalves). L'effet pathogène arrive quand les conditions de culture permettent la prolifération d'un microorganisme (caractère opportuniste) qui, lorsqu'il atteint une certaine concentration dans le milieu, induit des dommages à l'hôte (Paillard *et al.*, 2004). Cette concentration est appelée DL₅₀ qui signifie que le pathogène est en nombre suffisant pour induire 50% de mortalité. Selon les postulats de Koch (Paillard *et al.*, 2004), une bactérie est considérée pathogène lorsque :

- (i). un individu infecté peut contaminer un individu sain (transmissibilité);
- (ii). la bactérie pathogène peut être isolée et caractérisée (caractérisation);
- (iii). que l'infection par ce pathogène peut être reproduite expérimentalement sur des hôtes sains et que ce pathogène peut être à nouveau isolé des hôtes infectés (reproductibilité);
- (iv). que le pathogène peut être détecté chez des hôtes infectés naturellement et venant de différentes régions (universalité).

Ces postulats sont vérifiés dans le cas de pathogènes obligatoires dont la présence dans les milieux de cultures induit toujours l'apparition de mortalité. Pour les pathogènes opportunistes, la vérification de ces postulats n'est pas toujours réalisée. En effet, ceux-ci induisent de la mortalité quand les conditions de culture permettent leur prolifération et/ou quand les individus sont dans un état de « dépression » physiologique et immunitaire. C'est-à-dire lorsque que leur état physiologique les rend plus sensibles à la présence d'un pathogène. Elston (1999) met en avant plusieurs sources potentielles d'introduction d'un pathogène dans un système d'écloserie. Il distingue quatre sources principales d'infection. La première est l'eau utilisée pour la culture des larves. Les pathogènes peuvent se trouver directement dans l'eau pompée mais aussi dans le système de transport. Les systèmes de filtration, le traitement UV et le processus d'ozonation sont les techniques les plus couramment utilisées pour contrôler la charge bactérienne de l'eau. Une seconde source vient de la nourriture. La culture des microalgues nécessaires à l'alimentation des larves offre un milieu riche en nutriments idéal pour le développement bactérien (Nicolas *et al.*, 2004). Dans ce cas, la contamination peut aussi bien venir du stock d'algues initial que des milieux de culture des algues. Cette source d'infection est sans doute la plus importante mais aussi la plus difficile à contrôler. L'infection peut également venir des géniteurs et des œufs utilisés pour la production larvaire. Enfin, Elston (1999) insiste aussi sur le fait que l'apparition d'un pathogène peut se faire également via l'air environnant ou via les outils utilisés pour le travail de routine (bassin, gants, bottes,...).

L'émergence d'une bactérie pathogène dépend aussi de la structure des communautés bactériennes du milieu de culture des larves. Une bactérie pathogène est entourée d'une quantité importante d'autres espèces avec qui elle entre en compétition pour la nourriture et pour l'espace. Cette compétition va fortement influencer son développement et sa prolifération. L'apparition des mortalités de masse est donc souvent associée à un bouleversement des communautés bactériennes qui est lui-même lié à des changements dans l'environnement de la culture des larves. Ces changements permettent à une espèce pathogène d'être plus compétitive pour les ressources et de se multiplier (Torkildsen *et al.*, 2005; Bourne *et al.*, 2006). La nature des stimuli environnementaux qui induisent ces changements est encore mal connue. Cela pourrait être dû à des facteurs tels que la maturation du biofilm dans les bassins (Bourne *et al.*, 2006), à une forte densité larvaire et à l'augmentation de la disponibilité en nutriments (Robert *et al.*, 1996). A ces facteurs, il faut ajouter aussi qu'un individu infecté peut servir de vecteur pour la propagation du pathogène mais également de substrat lorsque celui-ci se décompose, ce qui contribue à la prolifération du pathogène. Ce processus de propagation de la maladie prend de l'importance lorsque les larves sont cultivées à forte concentration. Dans ce cas, lorsqu'un pathogène se développe dans les bassins, il prolifère rapidement pour atteindre un seuil de concentration capable d'induire une mortalité de masse.

Tableau 1.2. Liste des bactéries pathogènes chez les larves de bivalves (modifié de Paillard *et al.*, 2004).

Bactéries pathogènes	Hôte	Références
<i>Chlamydia</i>	<i>Argopecten irradians</i>	Leibovitz 1989
<i>V. tubiashii</i>	<i>C. virginica</i>	Tubiash <i>et al.</i> , 1965
<i>Vibrio tubiashi</i>	<i>O. edulis</i> <i>C. gigas</i>	Lodeiros <i>et al.</i> , 1987 Takabashi <i>et al.</i> , 2000
<i>V. alginolyticus</i>	<i>O. edulis</i> <i>O. edulis</i> <i>M. mercenaria</i> / <i>C. virginica</i> <i>A. ventricosus</i> / <i>N. subnodosus</i> / <i>A. maura</i> / <i>C. gigas</i>	Tubiash <i>et al.</i> , 1970 Lodeiros <i>et al.</i> 1987 Tubiash <i>et al.</i> , 1970 Luna-Gonzales <i>et al.</i> , 2002
<i>V. anguillarum</i>	<i>C. virginica</i> <i>M. mercenaria</i> <i>O. edulis</i> <i>O. edulis</i> <i>M. mercenaria</i> / <i>C. virginica</i>	Tubiash 1975 DiSalvo <i>et al.</i> , 1978 Lodeiros <i>et al.</i> 1987 Tubiash <i>et al.</i> , 1970
<i>V. anguillarum related</i>	<i>A. purpuratus</i>	Riquelme <i>et al.</i> , 1995b
<i>V. anguillarum related</i>	<i>C. virginica</i>	Brown 1981
<i>V. splendidus</i>	<i>C. gigas</i>	Sugumar <i>et al.</i> , 1998
<i>V. pectinica</i>	<i>P. maximus</i> <i>P. maximus</i>	Nicolas <i>et al.</i> , 1996 Lambert <i>et al.</i> , 1998 Lambert <i>et al.</i> , 2001
<i>V. tapesi</i>	<i>T. philippinarum</i>	Nicolas <i>et al.</i> , 1992
<i>V. coralliilyticus</i>	<i>C. gigas</i> <i>Perna canaliculus</i>	Ben-Haim <i>et al.</i> , 2003 Kesarcodi-Watson <i>et al.</i> , 2009
<i>Vibrio spp.</i>	<i>C. virginica</i> <i>C. virginica</i> <i>C. virginica</i> <i>C. virginica</i> <i>C. virginica</i> <i>C. virginica</i> <i>M. mercenaria</i> <i>M. mercenaria</i> <i>M. mercenaria</i> <i>C. virginica</i> <i>A. irradians</i> <i>Teredo navalis</i> <i>C. gigas</i> <i>C. gigas</i> <i>O. edulis</i>	Brown 1973 Leibovitz 1978 Brown and Losee 1978 Elston <i>et al.</i> , 1980 Elston <i>et al.</i> , 1981 Brown and Tettelbach 1988 Guillard 1959 Tubiash <i>et al.</i> , 1965 Garland <i>et al.</i> , 1983 Jeffries 1982
<i>Aeromonas sp.</i>	<i>C. virginica</i> <i>M. mercenaria</i>	Tubiash <i>et al.</i> , 1965
<i>Aeromonas spp.</i>	<i>C. gigas</i>	Garlan <i>et al.</i> , 1983
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>C. virginica</i> <i>M. mercenaria</i> <i>O. edulis</i> <i>Euvola ziczac</i>	Brown 1973 Guillard 1959 Lodeiros <i>et al.</i> , 1987 Lodeiros and Freitas, 1992

Les bactéries peuvent également constituer une part significative du régime alimentaire des bivalves (Crosby *et al.*, 1990; Douillet, 1993a,b). Plusieurs études ont montré qu'une alimentation mixte (algues et bactéries) pouvait avoir un effet bénéfique sur la croissance et

la survie des larves (Douillet et Langdon, 1994; Ruiz-Ponte *et al.*, 1999). La présence de certaines communautés bactériennes présentes à l'interface eau-substrat bactéries favorise également l'induction de la métamorphose et de la fixation chez les larves de *C. virginica* et *C. gigas*. Cela serait dû à la production de certains composé par les bactéries tels que le L-DOPA ou l'épinephrine (Fitt *et al.*, 1989, 1990). (Fitt *et al.*, 1989, 1990). Cependant, les effets du biofilm bactérien sur la fixation et la métamorphose dépendent de l'espèce étudiée. En effet, le biofilm bactérien induit la fixation chez *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* mais pas chez *Pecten maximus* (Tritar *et al.*, 1992). Des études sur des larves de balanes et de polychètes montrent également que le biofilm bactérien peut inhiber ou faciliter la fixation dépendamment de la densité bactérienne et de l'âge du biofilm (Olivier *et al.*, 2000; Huang et Hadfield, 2003; Qian, 2003; Dahms *et al.*, 2004). Enfin, il est important pour les larves d'être au contact avec différentes communautés bactériennes afin de stimuler la maturation de leur système immunitaire (Verschuere *et al.*, 2000; Gullian *et al.*, 2004). Tous ces éléments montrent bien la complexité des relations entre les larves et les communautés bactériennes qui les entourent. Cette complexité rend difficile le contrôle de l'environnement bactérien des larves. Chez certaines espèces de bivalves, l'utilisation d'antibiotique dans les bassins d'élevage est une façon d'assurer une bonne production larvaire. L'application de ces antibiotiques a pour avantage de diminuer la charge bactérienne des bassins, empêchant la prolifération des bactéries pathogènes. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation d'antibiotiques non-sélectifs comme le chloramphénicol, améliorerait le rendement en éclosion (meilleure survie) surtout pour les stades pré-métamorphiques (Sutton et Garrick, 1993; Nicolas *et al.*, 1996; Sugumar *et al.*, 1998; Pernet *et al.*, 2006a). Cependant, l'utilisation d'antibiotiques, en plus de présenter un risque potentiel de sélection de souches résistantes, peut affecter à la fois les bactéries bénéfiques et pathogènes, ce qui peut avoir un impact potentiel sur le développement des larves comme par exemple, en modifiant le taux de fixation et le succès de métamorphoses (Pernet *et al.*, 2006a).

L'émergence d'un pathogène dans le milieu de culture des larves induit également des changements importants dans le comportement des larves comme par exemple une baisse

de l'activité alimentaire, des déplacements circulaires répétés ou bien encore la rétraction du vélum. D'un point de vue structural, les pathogènes affectent l'intégrité physique des larves en occasionnant l'atrophie et la nécrose des tissus. La réduction du vélum est considérée comme un signe avant-coureur d'une infection par des *Vibrio sp.* Cette réduction est généralement suivie par la nécrose des tissus mous et le détachement du vélum (Tubiash *et al.*, 1965). Des cas de réduction du vélum suite à une exposition à des espèces de *Vibrio* pathogènes ont été décrits chez la moule *M. galloprovincialis* (Anguiano-Beltrán *et al.*, 2004), les huîtres *C. gigas* (Sugumar *et al.*, 1998; Estes *et al.*, 2004) et *C. virginica* (Elston et Leibovitz, 1980), et les pectinidés *Nodipecten subnodosus* (Luna-González, 2002), *Argopecten ventricosus* (Luna-Gonzalez *et al.*, 2002), *P. maximus* (Nicolas *et al.*, 1996), *A. purpuratus* (Riquelme *et al.*, 1995) et *Aequipecten irradians* (Tubiash *et al.*, 1965).

LES LIPIDES

Les lipides sont une des sources majeures du métabolisme énergétique et des matériaux essentiels pour la formation des membranes cellulaires. Le principal rôle des lipides neutres, essentiellement des triglycérides, est d'être une réserve d'acides gras qui seront destinés soit à être oxydés (β -oxydation) pour fournir de l'énergie (ATP) ou soit à être incorporés dans les phospholipides. Les phospholipides composent la bicouche lipidique des membranes. Les acides gras qui les composent créent une zone hydrophobe à l'intérieur des membranes formant une barrière imperméable à l'eau et aux molécules polaires. Les propriétés physiques de ces membranes sont donc déterminées par leur contenu en acides gras et par leurs interactions avec les cholestérols et les protéines. Les lipides ne servent pas uniquement comme précurseur énergétique ou comme constituant membranaire, ils facilitent également l'absorption des composés liposolubles (par ex : les vitamines A, D, E et K) et jouent un rôle important dans la production et la régulation des eicosanoïdes.

Les triglycérides

Les triglycérides sont des triesters de glycérol et d'acides gras (figure 1.3), insolubles dans l'eau. À masse égale, leur oxydation (β -oxydation) produit six fois plus d'énergie que celle du glycogène. Ils sont synthétisés à partir d'acyls-coA et du glycérol-3-phosphate dans le réticulum endoplasmique ou dans les peroxysomes (Voet et Voet, 1998).

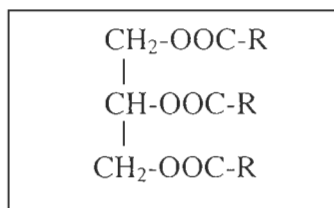


Figure 1.3. Structure des triglycérides (R : résidus d'acides gras)

Les lipides membranaires.

On distingue trois classes de lipides membranaires : les phospholipides, les ceramides aminoethylphosphonates et le cholestérol. La composition et la proportion relative de ces trois composés ainsi que leurs interactions avec les protéines et les sucres membranaires vont définir les propriétés physico-chimiques des membranes en les rendant plus fluides ou plus rigides, plus perméables ou moins perméables. Leur concentration respective dans les membranes varie d'une lignée cellulaire à l'autre (Voet et Voet, 1998).

Les phospholipides (PL) également appelés glycérophospholipides ou phosphoglycérides, sont les lipides membranaires les plus abondants. Ils sont formés à partir du glycérol-3-phosphate estérifié sur ses positions C₁ et C₂ par des acides gras et sur son groupe phosphoryle par un groupe X qui définit la classe du phospholipide (Figure 1.4). Les phospholipides sont donc des molécules amphiphiles avec des queues non polaires aliphatiques, les acides gras, et une tête phosphoryle X polaire. Les phospholipides les plus simples, pour lesquels le groupe X=H, sont les acides phosphatidiques. Ils se trouvent en faible quantité dans les membranes biologiques. Les phospholipides les plus

abondants et les plus complexes ont un groupe de tête X dérivé d'alcools polaires (éthanolamine, choline, sérine, *myo*-inositol, glycérol et phosphatidylglycérol).

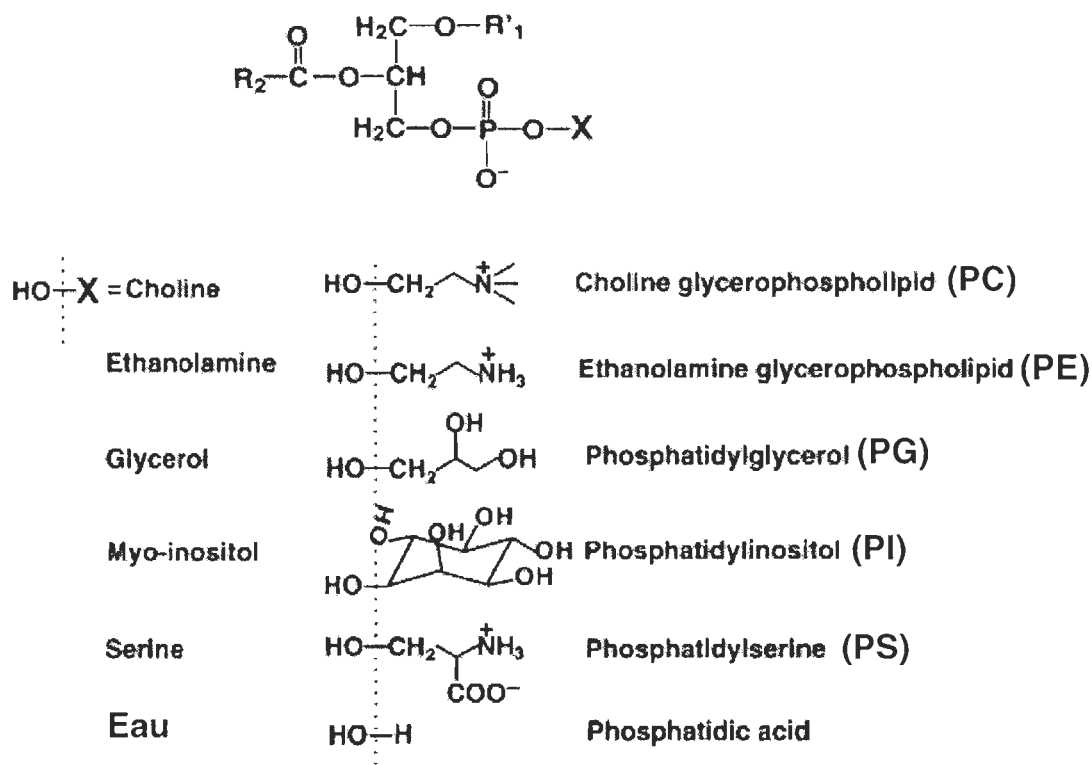


Figure 1.4. Structure des classes des phospholipides (extrait de Voet et Voet, 1998).

Les acides gras saturés (sans doubles liaisons) de 16 à 18 carbones occupent généralement la position en C₁ tandis que la position en C₂ contient des acides gras insaturés (avec doubles liaisons) de 16 à 24 carbones. La synthèse des phospholipides est réalisée dans le côté cytosolique des membranes du réticulum endoplasmique soit à partir des 1,2-diacyl-glycérols et des acides phosphatidiques ou soit par interconversion des différentes classes de phospholipides (Voet et Voet, 1998).

Les plasmanogènes sont des phospholipides dans lesquels le substituant sur le C₁ du résidu glycérol est lié à celui-ci par une liaison éther α,β -insaturée de configuration *cis*, au lieu d'une liaison ester. L'éthanolamine, la choline, et la sérine sont les groupes X les plus fréquents des plasmanogènes (Voet et Voet, 1998).

Les ceramides aminoethylphosphonates (CAEP) sont des lipides membranaires abondants chez les invertébrés marins. Leur structure est proche des sphingolipides qu'on retrouve chez les vertébrés. Le cholestérol est un constituant majeur des membranes plasmiques animales et se trouve en moindre quantité dans les membranes des organites subcellulaires. Il fait partie de la famille des stérols dont la structure de base correspond à 4 cycles carbonés fusionnés (noyau stéroïde). Son groupe OH lui confère un léger caractère amphiphile (faible polarité), tandis que sa structure cyclique fusionnée lui confère une rigidité supérieure aux autres lipides membranaires. Le cholestérol a donc une incidence importante sur la rigidité des membranes (Voet et Voet, 1998).

Les acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques avec de longues chaînes hydrocarbonées (ou acyles) de 4 à 36 C. Ils sont rarement à l'état libre dans la nature, et se trouvent essentiellement sous forme estérifiée comme constituants majeurs des différents lipides décrits dans ce chapitre. La plupart des acides gras ont un nombre pair d'atomes de carbone car ils sont généralement synthétisés par enchaînement d'unité en C_2 . Ils peuvent être sous la forme saturée (sans doubles liaisons) ou insaturée (avec doubles liaisons). On parlera d'acides gras polyinsaturés quand on trouve plusieurs doubles liaisons. La première double liaison d'un acide gras insaturé se trouve généralement entre les atomes C_9 et C_{10} , C_1 étant le carbone du groupe carboxylique. Avec les acides gras polyinsaturés, les doubles liaisons se situent à chaque troisième carbone en direction du groupe méthyle terminal de la molécule. Les doubles liaisons ne sont presque jamais conjuguées (Voet et Voet, 1998). En accord avec la nomenclature internationale, la position de la première double liaison est donnée par la notation $(n-x)^1$, en comptant le nombre d'atomes de carbones à partir du groupe méthyle terminal. Pour exemple, 18:4(n-3) est un acide gras de 18 atomes de carbones avec quatre doubles liaisons dont la première se situe sur le troisième carbone après le méthyle terminal. Cette notation sera celle qui sera utilisée dans ce travail.

¹ Le n est aussi noté ω d'où le nom d'oméga 3 et 6 (n-3 et n-6)

Cependant, une notation alternative pourra être utilisée pour la description des « NMI FA » (non-methylene-interrupted fatty acid). Dans ce cas, on indique la position de la double liaison à partir de C₁ (groupe carboxylique). Ainsi, le 18:4(n-3) sera noté 6,9,12,15-18:4. Dans cette notation, si les configurations des doubles liaisons ne sont pas toutes en position *cis*, on notera après le nombre du carbone la lettre Z si la double liaison est en *cis* et E si elle est en position *trans*. La figure 1.5 montre la structure ainsi que les deux nomenclatures pour le 18:4(n-3), 24:6(n-3) et le NMID (non-methylene-interrupted dienoic acid).

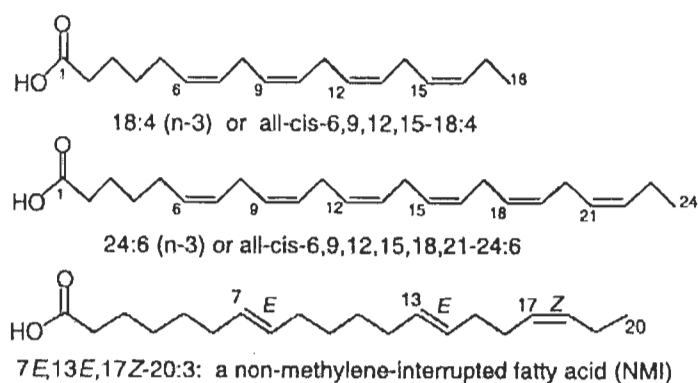


Figure 1.5. Illustration des nomenclatures des acides gras (extrait de Berge et Barnathan, 2005)

Les acides gras peuvent aussi avoir des noms usuels et systématiques. Le tableau 1.3 reprend les acides gras saturés et insaturés les plus fréquents.

Tableau 1.3. Nom usuel et systématique des acides gras les plus courants.

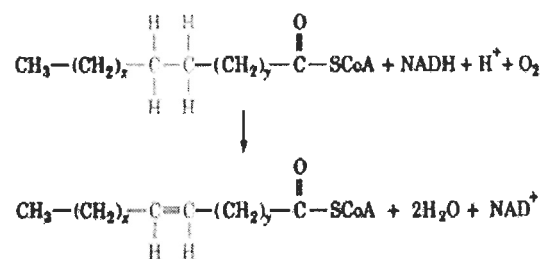
Symbole	Nom usuel	Nom systématique
Acides gras saturés		
16:0	Acide palmitique	Acide hexadécanoïque
18:0	Acide stéarique	Acide octadécanoïque
20:0	Acide arachidique	Acide eicosanoïque
Acides gras insaturés		
18:1(n-9)	Acide oléique	Acide octadécénoïque
18:2(n-6)	Acide linoléique	Acide octadécadiénoïque
20:4(n-6)	Acide arachidonique ou AA	Acide eicosatétraénoïque
20:5(n-3)	EPA	Acide eicosapentaénoïque
22:5(n-6)	DPA	Acide decosapentaénoïque
22:6(n-3)	DHA	Acide decohexanoïque

Les acides gras saturés sont des molécules très souples qui peuvent prendre des conformations variées en raison de la libre rotation relative autour de leurs liaisons C-C. Néanmoins, leur conformation en pleine extension correspond à un état de moindre énergie car elle implique un minimum d'interférence stérique entre les groupes méthylène voisins. Les points de fusions des acides gras saturés augmentent avec la masse moléculaire. Les doubles liaisons d'acides gras ont presque toujours une configuration *cis*. Cela entraîne une courbure de 30° de la chaîne hydrocarbonée, qui interfère avec leur compactage dans l'espace. Il en résulte une diminution des interactions de van der Waals qui se traduit par une baisse du point de fusion en fonction du degré d'insaturation. Le caractère fluide des lipides, pour les mêmes raisons, augmente avec le degré d'insaturation de leurs résidus d'acides gras (Voet et Voet, 1998).

La synthèse des acides gras se fait par condensation d'unités en C₂ à partir d'acétyl-coA et de malonyl-CoA dans le cytosol. Cette réaction de condensation est couplée à l'hydrolyse de l'ATP, ce qui rend la réaction irréversible. Ce processus se fait en deux étapes : (1) carboxylation ATP-dépendante de l'acétyl-coA en malonyl-CoA catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase et (2) décarboxylation exergonique du groupe malonyl lors de la réaction de condensation catalysée par l'acide gras synthase. Cette voie de synthèse est le processus de base de formation des acides gras et donne comme produit terminal

principalement de l'acide palmitique (16:0) mais aussi du 14:0, 18:0 et 20:0² (Voet et Voet, 1998 ; Bergé et Barnathan, 2005).

L'acide palmitique est le précurseur d'acides gras à chaînes plus longues et insaturées grâce à l'action des élongases et des désaturases. L'élongation dans les mitochondries est assurée par additions et réductions successives d'unités acétyles selon le processus inverse de celui de la β -oxydation. Les acides gras insaturés sont formés par des désaturases terminales. Chez les bivalves, on trouve trois désaturases terminales désignées par $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ et $\Delta 5$ -acyl-CoA désaturases. Ces enzymes à fer non hémique catalysent la réaction générale suivante :



où x est au moins égal à cinq et où $(\text{CH}_2)_x$ peut comporter une ou plusieurs doubles liaisons. La partie $(\text{CH}_2)_y$ du substrat est toujours saturée. Les doubles liaisons sont insérées entre des doubles liaisons déjà existantes de la partie $(\text{CH}_2)_x$ du substrat et le groupe CoA de sorte que la nouvelle double liaison se trouve trois carbones plus proche du groupe CoA que la double liaison suivante (pas de conjugaison avec une double liaison existante). Un certain nombre d'acides gras peuvent être ainsi synthétisés par combinaisons des réactions d'élongation et de désaturation. Cependant, comme l'acide palmitique est l'acide gras le plus court disponible chez les animaux, les règles ci-dessus empêchent la formation de la double liaison de l'acide linoléique (18:2(n-6)) à partir de l'acide oléique (18:1(n-9)). En fait, la $\Delta 9$ -désaturase permet la formation du 16:1(n-7), 18:1(n-9) et du 20:1(n-11). Seuls les organismes photosynthétiques possèdent des $\Delta 12$ - et $\Delta 15$ -désaturases qui permettent de

² Le 20:0 peut être également produit par élongation.

former les acides gras polyinsaturés ou « PUFA » (polyunsaturated fatty acid) de type n-3 et n-6. Les animaux devront donc puiser dans leur alimentation ces acides gras dits « essentiels » pour assurer le bon fonctionnement de leur métabolisme. Les bivalves marins trouvent ces acides gras essentiels dans le phytoplancton qui compose la majeure partie de leur alimentation. Ces microalgues marines grâce à la $\Delta 12$ - et à la $\Delta 15$ -désaturases peuvent transformer l'acide oléique (18:1(n-9)) successivement en acide linoléique (18:2(n-6)), en acide linoléinique (18:3(n-3)) et *in fine* en acide eicopentaénoïque ou EPA (18:3(n-3)). Au travers des désaturations et des élongations, 18:2(n-6) pourra être converti en acide arachidonique ou AA (20:4(n-6)). L'acide decosahéaénoïque ou DHA (24:6(n-3)) est obtenu via des PUFA de C₂₄ intermédiaires plutôt que par élongation de l'EPA, selon la voie métabolique « Sprecher ». Ce schéma biosynthétique est typique des dinoflagellés chez qui le 18:4(n-3) et le DHA sont prédominants. De même, la voie de biosynthèse de 16:4(n-1) à partir du 16:0 est caractéristique des diatomées. Cette capacité des algues marines de produire des acides gras essentiels en font un maillon central du réseau alimentaire marin. La figure 1.6 reprend les voies d'élongation et de désaturation des acides gras que l'on retrouve chez ces algues marines (Voet et Voet, 1998; Berge et Barnathan, 2005).

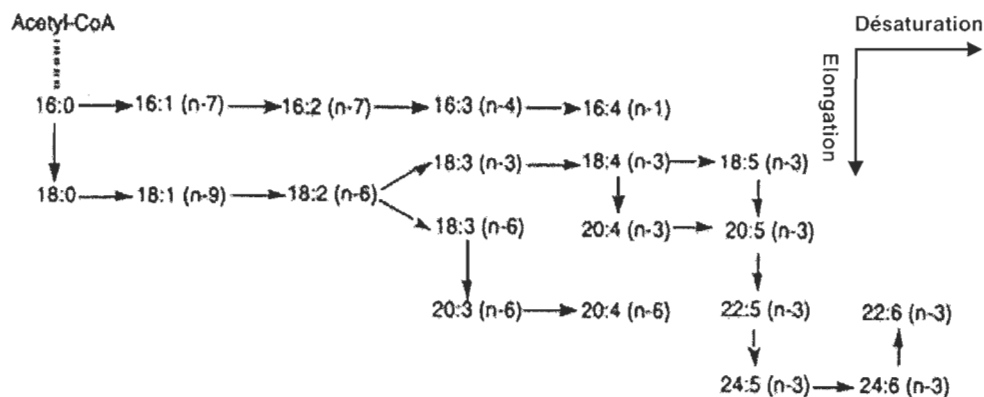


Figure 1.6. Voie d'élongation et de désaturation des acides gras chez les algues marines (extrait de Bergé et Barnathan, 2005)

Les bivalves ont la capacité de synthétiser *de novo* des acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type NMI. Les principaux sont les NMI diénoïques 22 carbones, ou plus précisément le 22:2 $\Delta 7,13$ (NMIi) et 22:2 $\Delta 7,15$ (NMIj). Comme illustré dans la figure 1.7, ceux-ci sont synthétisés par élongation et $\Delta 5$ désaturation du 18:1(n-9) et 16:1(n-7), deux acides gras très abondants dans le phytoplancton.

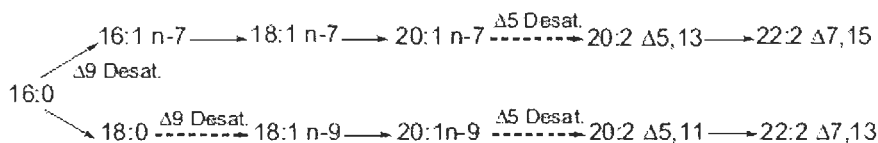


Figure 1.7. Voie de biosynthèse du 22:2 $\Delta 7,13$ (NMIi) et 22:2 $\Delta 7,15$ (NMIj) (extrait de Barnathan 2009).

Le rôle fonctionnel des NMI chez les bivalves est encore méconnu, bien qu'il ait été proposé qu'une compétition puisse exister entre les NMI et les PUFA chez les organismes marins (Pirini *et al.*, 2007; Ventrella *et al.*, 2008). Klingensmith (1982) a montré qu'une déficience en acides gras essentiels était corrélée avec une activation de la synthèse des 20:2 et 22:2 NMI chez *M. mercanaria*. L'incorporation préférentielle des NMI dans les lipides polaires, parfois au détriment des acides gras de type oméga 3, ainsi qu'une distribution sélective dans les tissus et organes exposés à l'environnement extérieur, suggère un rôle fonctionnel et structurel des NMI dans les membranes biologiques (Pirini *et al.*, 2007). La configuration particulière de l'insaturation des NMI, comparativement aux PUFA, devrait conférer selon Barnathan (2009), une meilleure résistance des membranes cellulaires face aux processus d'oxydation et aux lipases bactériennes. De plus, les NMI peuvent être employés pour contrôler et réparer des dommages structurels et fonctionnels induits par une diminution des PUFA dans les lipides de structure, particulièrement dans la couche interne des membranes cellulaires où les NMI sont préférentiellement incorporés (Kraffe *et al.*, 2004).

Lipides et développement larvaire

Les triglycérides constituent la réserve principale des larves et fournissent la majeure partie de l'énergie nécessaire à l'embryogenèse et à la métamorphose. Il a été montré que les lipides neutres constituent entre 66% et 79% des lipides totaux dans les œufs, les embryons et les larves chez *Crassadoma gigantea* (Whyte *et al.*, 1990, 1992); aux stades larvaires chez l'huître européenne, *Ostrea edulis* (Holland et Spencer, 1973) et chez les juvéniles de l'huître américaine *C. virginica* (Chu et Webb, 1984). Pendant la métamorphose, les larves sont limitées dans leur capacité à se nourrir et à accumuler des réserves endogènes, principalement des TAG et des protéines (Baker et Mann, 1994). C'est pourquoi, le succès du développement larvaire dépendra aussi de l'acquisition de réserves suffisantes en TAG pour répondre à la demande énergétique inhérente à la métamorphose (Holland et Spencer, 1973; Rodriguez *et al.*, 1990; Whyte *et al.*, 1992; Videla *et al.*, 1998a; Labarta *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999; García-Esquivel *et al.*, 2001; Pernet *et al.*, 2006a). Pour cette raison, le contenu en TAG est souvent utilisé comme un indice de l'état physiologique et énergétique des larves avant la métamorphose (Gallager *et al.*, 1986; Fraser, 1989). Plusieurs études sur les réserves énergétiques des stades larvaires ont montré que des niveaux en TAG élevés étaient associés à de meilleurs taux de croissance et de survie chez *O. edulis* (Holland and Spencer, 1973), *C. gigas* (Waldock et Nascimento, 1979; García-Esquivel *et al.*, 2001), *P. maximus* (Delaunay *et al.*, 1992) et *P. magellanicus* (Pernet *et al.*, 2003; Pernet *et al.*, 2006a). L'impact des TAG dans l'alimentation sur la croissance, la survie et le taux de fixation a été traité chez des larves de *Mytilus sp.* (Pernet *et al.*, 2004).

Plusieurs recherches ont montré qu'une alimentation comprenant des acides gras essentiels influence la croissance et la survie larvaire chez les bivalves (Whyte *et al.*, 1989; Delaunay *et al.*, 1993; Coutteau *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1994; Soudant *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 1999; Farias *et al.*, 2003; Nevejan *et al.*, 2003b; Pernet et Tremblay, 2004; Pernet *et al.*, 2005; Rico-Villa *et al.*, 2006). Il a été rapporté également que les acides gras polyinsaturés de la famille des omega 3 et 6 étaient essentiels pour soutenir une croissance

optimale chez certaines espèces de bivalves aux stades larvaires et juvéniles (Langdon et Waldock, 1981; Chu et Webb, 1984; Waldock et Holland, 1984; Pernet et Tremblay, 2004; Pernet *et al.*, 2005). Par exemple, de bons niveaux en AA et DPA (oméga 3) dans la nourriture favorisent la croissance des post-larves de *P. magellanicus* (Milke *et al.*, 2004). Inversement, de fortes mortalités et des taux de croissances plus faibles chez des larves de *P. magellanicus* ont été associés à de faibles niveaux en AA (Pernet and Tremblay, 2004). Le succès de la métamorphose est aussi influencé par le contenu en acides gras polyinsaturés des larves. Delaunay *et al.* (1993) ont montré que chez *P. maximus*, le taux de métamorphose était influencé par le contenu en DPA et en DHA. De même, Pernet *et al.* (2005) ont montré que chez *P. magellanicus*, une faible production de pédivéligères pouvait être associée à un faible taux en DPA dans la nourriture. Au cours du développement larvaire, un remaniement du profil des acides gras des membranes se produit pendant les phases endo- et mixotrophe. Ces changements sont le résultat d'une redistribution complexe des acides gras dans les différentes classes de lipides (Soudant *et al.*, 1998). Deux raisons peuvent expliquer pourquoi les acides gras ont autant d'influence sur la performance larvaire. La première est que les acides gras polyinsaturés de type oméga 3, principalement le DHA et le DPA, sont incorporés dans les phospholipides membranaires et jouent un rôle important dans l'intégrité structurale et fonctionnelle de ces mêmes membranes (Hazel, 1995; Hulbert et Else, 1999). La seconde est que l'AA et l'EPA des membranes sont utilisés pour la synthèse de composés impliqués dans l'immunité : les eicosanoïdes (Howard et Stanley, 1999). Ceux-ci se comportent à la fois comme des médiateurs intercellulaires et des hormones locales et jouent de nombreux rôles physiologiques et physiopathologiques. Il existe deux voies de synthèses pour les eicosanoïdes (figure 1.8) : la cyclique qui forme les prostaglandines, les prostacyclines et les thromboxanes ; et la linéaire qui donne les leucotriènes, les hépoxines et les lipoxines. (Voet et Voet, 1998).

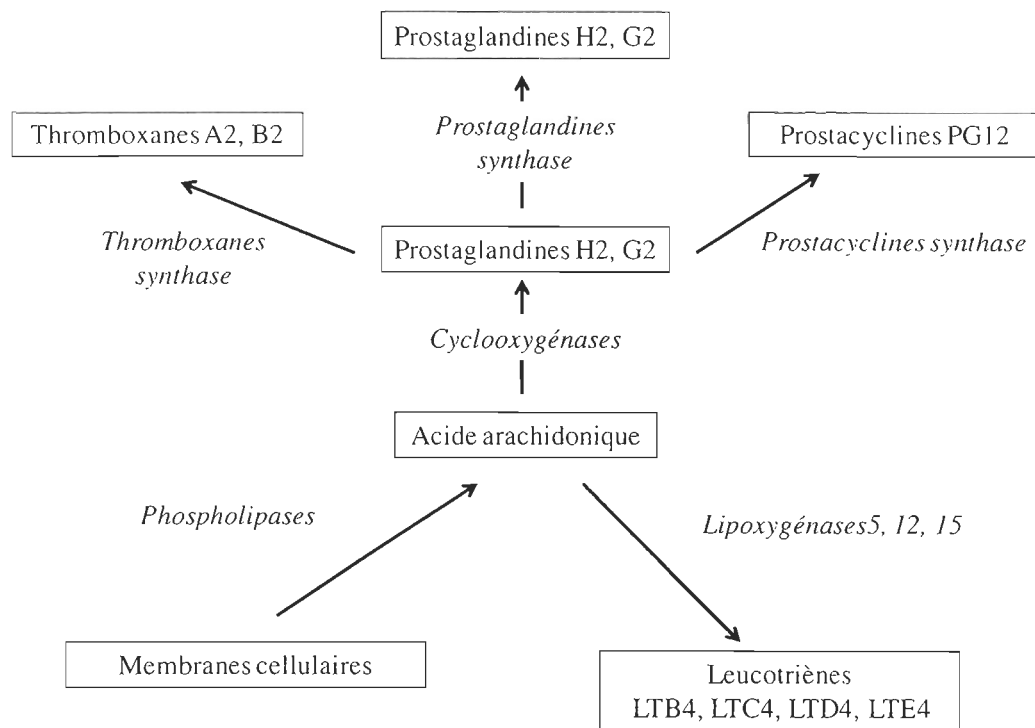


Figure 1.8. Voies de synthèse des eicosanoïdes. Les enzymes sont en italique. Voir le texte pour les explications.

Dans les défenses immunitaires, les prostaglandines et les leucotriènes sont impliquées dans les réactions inflammatoires alors que les lipoxines ont un rôle dans les processus anti-inflammatoires (Levy *et al.*, 2001). Leur fonction chez les bivalves a été très peu étudiée (Saintsing *et al.*, 1983; Ruggeri et Thoroughgood, 1985; Osada *et al.*, 1989; Hurtado *et al.*, 2009). Dans des études effectuées sur d'autres invertébrés, il a été montré que les eicosanoïdes jouaient un rôle dans la médiation de l'immunité cellulaire (Stanley et Howard, 1998; Rowley *et al.*, 2005). Plus précisément, des études réalisées sur des insectes ont montré que les eicosanoïdes modulent les réactions de phagocytoses, de nodulation et d'encapsulation ; et induisent la synthèse de composé antibactérien (Tunaz *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2009). Bien que l'aspect immunitaire des acides gras n'a pas encore été beaucoup traité chez les bivalves, plusieurs travaux ont été menés pour mettre en avant l'importance d'une alimentation riche en acides gras polyinsaturés sur les fonctions

immunitaires des hémocytes chez *C. gigas* (Delaporte *et al.*, 2006), *C. virginica* (Ashton-Alcox et Ford, 1998; Hegaret *et al.*, 2004) et *Ruditapes philippinarum* (Oubella *et al.*, 1993; Delaporte *et al.*, 2003). Delaporte *et al.* (2006) ont montré que chez *C. gigas*, une alimentation riche en acide arachidonique augmentait le nombre d'hémocytes, la phagocytose et la production d'espèces réactives de l'oxygène, effets qui selon les auteurs, seraient liés à utilisation de l'acide arachidonique comme précurseur des eicosanoïdes. De plus, l'accumulation de granules lipidiques dans le tractus digestif chez des larves de *Argopecten ventricosus* (Sainz, 1998) et *C. virginica* (Elston et Leibovitz, 1980) lorsqu'elles sont exposées à des *Vibrio sp.*, suggère également un rôle des lipides dans la réponse aux pathogènes. Dans cette optique, l'amélioration des performances larvaires en relation avec le contenu en AA et EPA des larves serait liée à une optimisation des leurs défenses immunitaires.

MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

L'activation de la réponse immunitaire et des processus associés nécessite de l'énergie ou de l'ATP que les larves vont tirer de leurs substrats énergétiques grâce à l'activation des différents complexes enzymatiques du métabolisme énergétique (figure 1.9).

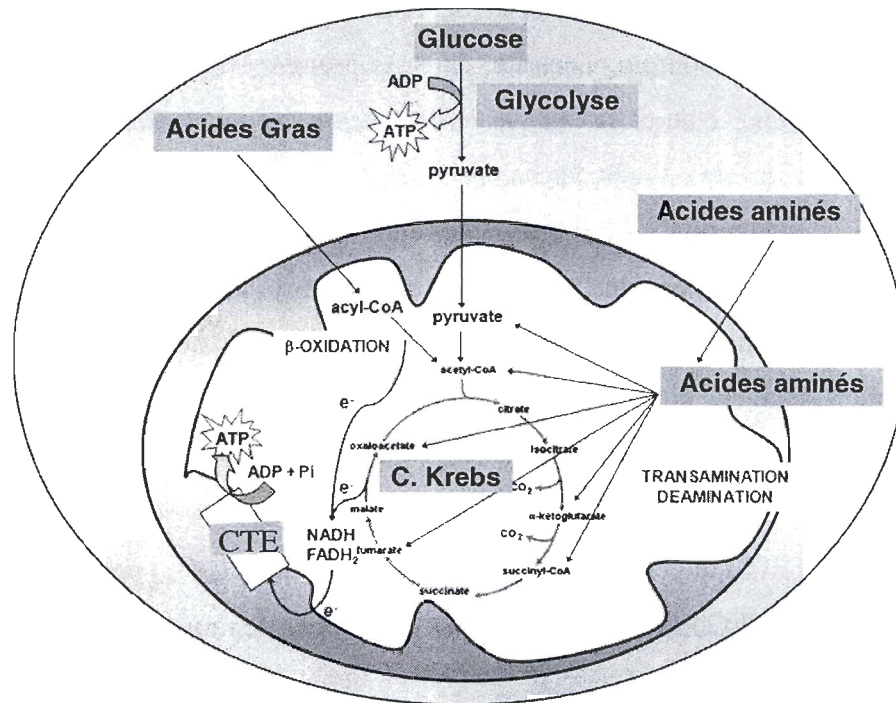
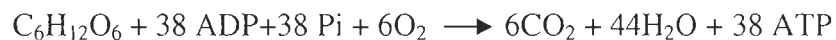


Figure 1.9. Vue générale du métabolisme énergétique (extrait de www.nature.com/scitable).
Abbréviations : C. Krebs : cycle de krebs; CTE : Chaîne de transport des électrons.

La synthèse d'ATP par voie aérobie est basée sur l'oxydation des formes réduites du NADH et FADH₂ produits lors de la glycolyse et du cycle de Krebs. Cette réaction implique aussi la réduction de l'oxygène lors de son passage dans la chaîne respiratoire. Toutes les enzymes impliquées dans le cycle de Krebs et dans la chaîne de transport d'électrons sont situées dans la matrice et dans la membrane interne de la mitochondrie. Le

métabolisme aérobie produit 38 molécules d'ATP par mole de glucose selon l'équation suivante :



L'oxydation (β -oxydation) des acides gras va fournir de l'acétyl-CoA qui va rentrer dans le cycle de Krebs et produire du NADH et du FADH₂ qui seront utilisés pour la synthèse d'ATP. Cette voie métabolique nécessite, dans un premier temps, la libération des acides gras des triglycérides. Celle-ci se fait par hydrolyse ou saponification grâce à l'action des lipases. Pour pouvoir être oxydés, les acides gras doivent être préparés à la réaction grâce à une réaction d'acylation ATP-dépendante qui forme un acyl-CoA. Ce processus d'activation est catalysé par une famille d'au moins trois acyl-CoA synthétases (appelées aussi thiokinases) qui sont différentes selon la spécificité de longueur de chaîne. Ces enzymes sont associées soit au réticulum endoplasmique soit à la membrane externe des mitochondries. Une fois activé, les acides gras doivent être transportés du cytosol aux mitochondries pour pouvoir subir la β -oxydation. Ce processus fait intervenir quatre réactions (figure 1.10) qui permettent la rupture de la liaison C _{α} -C _{β} pour donner de l'acétyl-CoA et un nouvel acyl-Coa avec deux atomes de carbones de moins (Voet et Voet, 1998).

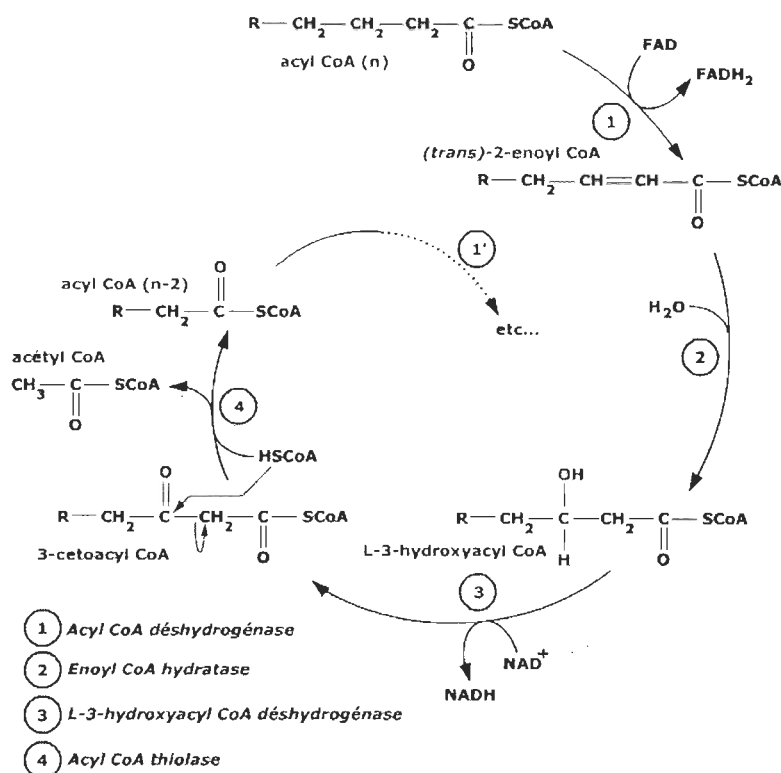


Figure 1.10. Schéma des quatre étapes de la β -oxydation. Les numéros correspondent à chacune des enzymes impliquées dans la libération d'un acétyl-CoA (extrait de Voet et Voet, 1998).

Les acides aminés issus de la dégradation des protéines peuvent également être utilisés comme précurseur énergétique. La plupart des voies impliquées dans la métabolisation des acides aminés débutent par une transamination qui donne l'acide α -cétonique correspondant accompagné du transfert éventuel du groupe aminé à l'urée via le cycle de l'urée. On parlera d'acides aminés céto-gènes lorsqu'ils peuvent être transformés en acétyl-CoA et en acétoacétate. Les autres sont appelés « glucoformateurs » car ils peuvent, du moins en partie, être formés en précurseur du glucose (pyruvate, oxaloacétate, α -céto-glutarate, succinyl-CoA). Qu'ils soient céto-gènes ou glucoformateurs, les acides aminés seront également réintégrés dans le cycle de Krebs pour produire du NADH et du FADH₂ et *in fine* de l'ATP. L'acétyl-CoA et le pyruvate jouent donc un rôle central dans la dégradation de la plupart des combustibles métaboliques et s'affichent comme les

composés clés du métabolisme énergétique (Voet et Voet, 1998). D'un point de vue de l'utilisation des réserves énergétiques, à court terme, les organismes métaboliseront préférentiellement les hydrates de carbones. Si la demande énergétique augmente ou si les niveaux d'alimentation chutent (déficit alimentaire), les réserves lipidiques seront métabolisées et en dernier recours, les protéines si la situation ne s'améliore pas.

Métabolisme énergétique et développement larvaire.

Pour leur développement, les larves disposent de trois sources principales d'énergie : les lipides, les protéines et les hydrates de carbones. L'importance des lipides dans le développement larvaire a été discutée dans la section précédente et ne sera pas répétée ici.

Les protéines sont la principale fraction biochimique des œufs (Holland, 1978) et des larves (Whyte *et al.*, 1987; His et Maurer, 1988; Whyte *et al.*, 1990) chez les bivalves. Cependant, leur importance en tant que précurseur énergétique avant et après la métamorphose reste controversée (Holland et Spencer, 1973; Bartlett, 1979). Seules quelques études ont montré que les lipides et les protéines avaient une importance égale dans le développement des bivalves chez *O. edulis* (Rodriguez *et al.*, 1990), *O. chilensis* (Videla *et al.*, 1998b), et chez *Argopecten purpuratus* (Farias *et al.*, 1998). Chez *C. gigas*, l'utilisation des protéines durant la métamorphose apparaît être nécessaire à la survie des larves (Garcia-Esquivel *et al.*, 2001). Enfin, les hydrates de carbones comptent pour moins de 5% du contenu organique total des larves de bivalves et son implication dans le développement larvaire semble être moins importante que celui des lipides et des protéines (Garcia-Esquivel *et al.*, 2001).

L'oxydation aérobie des lipides, des protéines et des hydrates de carbones en énergie est réalisée *in fine* dans les mitochondries. Cette oxydation implique une série de réactions d'oxydoréductions au niveau du cycle de Krebs et le transfert d'électron des substrats intermédiaires à l'oxygène (l'accepteur final) via la chaîne de transport d'électrons. L'activité des complexes enzymatiques du cycle de Krebs et de la chaîne de transport d'électrons représentent le potentiel aérobie total des organismes. Le ratio entre

l'oxygène consommé et l'activité de la chaîne de transport des électrons a été largement utilisé comme un indicateur de l'activité métabolique, notamment chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha* (Madon *et al.*, 1998) et chez *C. gigas* (Garcia-Esquivel *et al.* 2001). Dans cette étude, les auteurs ont mesuré une augmentation de la consommation en oxygène et de l'activité de la chaîne respiratoire pendant la métamorphose. Une autre étude réalisée sur *C. gigas* montre que cette augmentation de la respiration pendant la métamorphose ne se produit pas si les larves sont en condition de jeûne prolongé (Garcia-Esquivel *et al.*, 2002; Moran et Manahan, 2004). Dans ce même travail, deux autres indicateurs de l'activité du métabolisme aérobie ont été utilisés pour estimer l'activité métabolique. Ces indicateurs sont la citrate synthase (cycle de Krebs) et la cytochrome C oxydase (chaîne respiratoire). L'activité de la citrate synthase (CS), de par son caractère limitant dans le cycle de Krebs, est un excellent indicateur du métabolisme aérobie. Il en va de même pour la cytochrome C oxydase (CCO) qui est une enzyme limitante des oxydations phosphorylantes. En condition de sous-alimentation, ces deux enzymes affichent un niveau d'activité basal qui n'augmente que lorsque les larves se nourrissent à nouveau (Moran et Manahan, 2004).

IMMUNITÉ CHEZ LES BIVALVES

L'immunité chez les bivalves est principalement constituée de mécanismes innés regroupés en processus cellulaires et humoraux nécessitant préalablement la reconnaissance du corps étranger, c'est-à-dire la capacité de distinguer le « soi » du « non-soi ». L'immunité cellulaire comprend toutes les cellules immunitaires impliquées dans l'évacuation des corps étrangers par phagocytose, nodulation ou encapsulation. L'immunité humorale reprend tous les processus acellulaires impliqués dans la reconnaissance du « non-soi », dans l'activation des cellules immunitaires, dans les mécanismes phagocytaires et dans la production de composés antimicrobiens qui permet l'élimination des corps étrangers. Les données sur les capacités de défense immunitaire aux stades larvaires chez

les invertébrés marins sont peu documentées et concernent principalement des données au niveau cellulaire.

Immunité cellulaire

Les premières observations de cellules phagocytaires chez des larves de bivalves ont été réalisées par Yonge (1926) chez *Ostrea edulis*. La phagocytose de bactéries par des cellules larvaires a été reportée par Elston et Leibovitz (1980) chez *C. virginica*. Lors de leurs recherches sur les espèces pathogènes du genre *Vibrio*, ces auteurs ont observé des phagocytes mobiles contenant des fragments bactériens. Ils ont remarqué également l'extrusion de phagocytes à travers le velum. Cette activité phagocytaire a été observée pour chaque stade du développement larvaire et se passe toujours lors d'infections par des bactéries. Par la suite, Elston (1980b) a identifié ces cellules comme des cœlomocytes qu'il classe en deux types cellulaires selon qu'ils possèdent une activité phagocytaire ou non. Aux stades véligères (prodissonches I et II), ces deux types de cœlomocytes ont été observés dans la cavité viscérale et dans les canaux du système circulatoire en formation. Une analyse en microscopie électronique a montré que les cœlomocytes à activité phagocytaire possèdent sur leur membrane des vacuoles et contiennent des mitochondries et un cytoplasme dense et granuleux. Les cœlomocytes non-phagocytaires sont référencés comme des cellules de réticulum endoplasmique lisse qui, en comparaison avec le type phagocytaire, affichent une concentration plus faible en mitochondries et en appareils de Golgi (Elston, 1980a). Malgré la relative ancienneté de ces travaux, peu d'études ont été réalisées depuis pour mieux comprendre les caractéristiques immunologiques de ces cœlomocytes. Cela s'explique par l'impossibilité d'extraire ces cœlomocytes des larves et donc de faire des études analogues à celles réalisées sur les hémocytes des adultes.

Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire regroupe les processus permettant la migration et l'agrégation des hémocytes vers les sites infectieux (Martin *et al.*, 1993). Ces processus ont

été observés chez les mollusques (Renault *et al.*, 1995). Le développement des approches génomiques et des banques EST (Expressed Sequence Tag) ont permis d'isoler plusieurs gènes associés à la prolifération cellulaire et à l'hématopoïèse chez *C. gigas*. Le gène Cg-Tal, un des premiers à avoir été décrit, présente une structure homologue au gène Tal1/SCL (Barreau-Roumiguiere *et al.*, 2003). Chez les vertébrés, l'activation de Tal1/SCL est primordiale pour le déclenchement de l'hématopoïèse et la formation de cellules précurseurs d'hémocytes (Shivdasani *et al.*, 1995; Porcher *et al.*, 1996). Une banque EST montée à partir d'hémocytes a permis de mettre en évidence un autre gène connu comme régulateur du cycle cellulaire, Cg-Drac3 (Gueguen *et al.*, 2003). La protéine Drac3 est une petite GTPase de la famille Rho qui est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose chez la drosophile (Sasamura *et al.*, 1997). L'étude de l'expression de gènes associés à la réponse immunitaire pendant le développement de *C. gigas*, a montré que ces deux gènes étaient exprimés dès les stades gastrula-trochophore (Tirape *et al.*, 2007). Une autre voie importante de la prolifération cellulaire est la voie de signalisation Rel/NF- κ B. Chez les vertébrés, la réponse immunitaire est initiée par la reconnaissance des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce phénomène provoque l'activation de récepteurs cellulaires et des voies de signalisation impliquées dans la réponse aux stress et la réponse immunitaire (Leppa et Bohmann, 1999; Hoffmann et Reichhart, 2002). Chez l'huître *C. gigas*, l'établissement d'une banque d'EST d'hémocytes a permis de mettre en évidence quatre ADNc homologues à des molécules adaptatrices et des facteurs de transcription de la voie NF- κ B des vertébrés et de drosophile : MyD88, TRAF, ECSIT et un homologue de I κ B (Gueguen *et al.*, 2003). De plus, la caractérisation des gènes oIKK et Cg-Rel (Escoubas *et al.*, 1999; Montagnani *et al.*, 2004) tendent à confirmer l'existence de la cascade Rel/NF- κ B chez l'huître. L'étude de l'expression des ces différents gènes pendant l'ontogénie, a permis de voir que ces gènes sont exprimés dès les premiers stades du développement. De plus, la réponse de ces différents gènes à une stimulation bactérienne a conduit à la proposition d'un schéma de l'activation de la voie Rel/NF- κ B chez l'huître du pacifique (Figure 1.11). L'activation de la voie serait initiée par l'association entre les LPS bactériens et le récepteur

Toll-like récepteur 4 (TLR-4), non mis en évidence chez *C. gigas* mais présent chez *C. virginica* (Tanguy *et al.*, 2004). Cette association conduirait à l'activation des molécules adaptatrices (MyD88, Cg-TRAF, Cg-ECSIT) qui vont être recrutées successivement pour aboutir à la formation d'un complexe lié au récepteur. La formation de ce complexe permet l'activation de la cascade de phosphorylation par l'intermédiaire de kinases, aboutissant à l'activation du complexe oIKK, la dégradation de l'inhibiteur Cg-IκB et la dissociation du facteur de transcription Cg-Rel de son inhibiteur Cg-IκB (Montagnani *et al.*, 2004; Montagnani *et al.*, 2008). Cg-Rel serait impliqué au niveau des hémocytes dans la régulation des gènes immunitaires portant des sites κB tels que Cg-timp (Montagnani *et al.*, 2001; Montagnani *et al.*, 2007) ou des peptides antimicrobiens comme démontré chez la drosophile (Hoffmann et Reichhart, 2002).

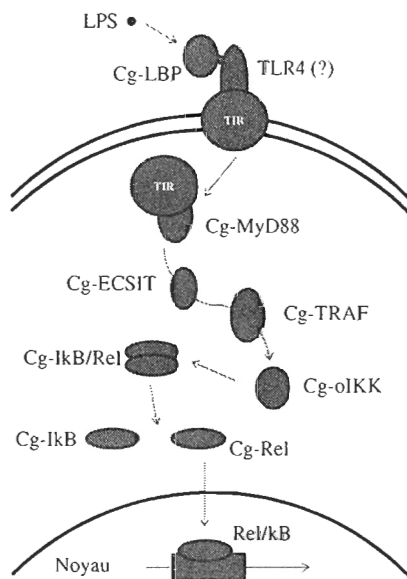


Figure 1.11. Voie de signalisation Rel/NF-κB dans un hémocyte de *C. gigas*. Voir texte pour la description de la voie (modifié de Tirapé, 2007).

Reconnaissance du soi

La première étape de la réponse immunitaire est la détection par les hémocytes (ou cœlomocytes) des corps étrangers ou des tissus du « non-soi », via des récepteurs associés à

la surface des membranes. Ces récepteurs se lient aux antigènes d'origine microbienne dont les principaux sont des lipopolysaccharides (LPS), des acides lipoteichoïques, des lipoprotéines et du peptidoglycane (PGN) pour les bactéries et des β -1,3-glucanes pour les microorganismes d'origine fongique (Begum *et al.*, 2000; Iwanaga et Lee, 2005). Chez les mollusques, on peut classer ces récepteurs en trois catégories (Humphries et Yoshino, 2003) : les lectines, des protéines de type intégrine, les récepteurs à hormone de croissance et à cytokines. L'activation de ces récepteurs va induire plusieurs processus immunitaires qui vont de l'agglutination des corps étrangers (mélanisation et opsonisation), à la production de peptides antibactériens en passant par l'induction de la « poussée oxydative » et par la médiation cellulaire des hémocytes.

Les protéines de liaison aux LPS

Chez l'huître du pacifique, deux protéines plasmatiques capables de se lier aux LPS ont été caractérisées, Cg-LBP/BPI (*C. gigas* LPS Binding Protein/ Bactericidal Permeability Increasing protein) et Cg-EcSOD (*C. gigas* Extracellular Superoxide Dismutase) (Gonzalez *et al.*, 2005). L'étude structurale de Cg-LBP/BPI a conduit à la rapprocher plus d'une BPI que d'une LBP (Gonzalez *et al.*, 2007a). Chez les vertébrés, BPI agit comme un agent perméabilisant des membranes lipidiques externe et interne des bactéries, favorisant leur phagocytose par les neutrophiles (Levy, 2000). Les données expérimentales obtenues pour Cg-LBP sur l'affinité aux LPS permettent de proposer que cette protéine peut participer aux mécanismes de reconnaissance et d'opsonisation des bactéries Gram (-) (Gonzalez *et al.*, 2007b). Cg-BPI pourrait ainsi participer à une première ligne de défense et aussi être impliqué dans la réponse immunitaire aiguë lors d'une infection. Cg-EcSOD a été identifiée comme une Cu/ZnSOD (enzymes antioxydantes) spécifique aux hémocytes ayant une capacité de liaison aux LPS qui favoriserait l'identification et l'élimination des bactéries par des liaisons aux intégrines (Gonzalez *et al.*, 2005). Cette double propriété de la protéine Cg-EcSOD suggère que cette molécule participerait à la régulation de la réponse inflammatoire tout en permettant la détoxification des tissus internes et l'amélioration de la capacité des hémocytes à résister à des dommages oxydatifs (Gonzalez *et al.*, 2005). Tirapé

et al (2007) ont montré que les gènes de Cg-LPB-BPI et Cg-EcSOD sont exprimés tout au long du développement larvaire chez *C. gigas*. Chez *C. virginica*, l'identification d'un gène associé à une protéine liant spécifiquement les LPS est également disponible dans les travaux de Cunningham *et al.* (2006).

Les lectines

Les lectines ou agglutinines sont des glycoprotéines qui agissent comme des opsonines en se liant spécifiquement avec des hydrates de carbones présents à la surface d'agents étrangers (Vasta *et al.*, 1994). Elles s'agglutinent autour de ceux-ci, ce qui facilite leur phagocytose. Elles seraient produites par les hémocytes eux-mêmes (Humphries et Yoshino, 2003; Sharon et Lis, 2004; Ottaviani, 2006). Chez les bivalves, des travaux sur les lectines ont été effectués chez *R. philippinarum* (Bulgakov *et al.*, 2004), chez *C. gigas* (Tripp, 1966), chez *C. virginica* (Olafsen *et al.*, 1992) et chez *M. edulis* (Renwranz et Stahmer, 1986). Chez *C. gigas*, deux gicalines (-E et -H) capables d'agglutiner des bactéries tels que *Vibrio anguillarum* ont été identifiées (Olafsen *et al.*, 1992). La construction d'une banque d'EST à partir d'hémocytes stimulés a permis de mettre en évidence deux autres types de lectines, les ficolines et les galectines (Gueguen *et al.*, 2003). Les lectines de type ficoline induisent l'activation de la voie alternative des lectines MASPs (MBL-associated Serines Protéases) (Teh *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2004). Les galectines sont caractérisées par leur affinité aux sucres de type β -galactosides (Cooper et Barondes, 1999). Il existe plusieurs type de galectines, classées en fonction de leur structure allant de polypeptides contenant un CRD (carbohydrate recognition domain) pouvant former des homodimères (galectine-1 et -2) ou des monomères (-5 -7, -10), à des tandems de différents CRD (-4, -6, -8, -9). Leur implication dans l'immunité est encore mal connue. Chez les vertébrés, les galectines semblent être impliquées dans une variétés de processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose, l'adhésion cellulaire, la réparation de lésions et l'encapsulation (Vasta *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 2002; Rabinovich et Gruppi, 2005). Chez l'huître, une nette augmentation du niveau des transcrits de galectine a été observée dans des hémocytes stimulés par des bactéries non pathogènes (Gueguen *et al.*, 2003). Tanguy *et*

al. (2004) ont mis en évidence la surexpression d'un gène codant pour une lectine (beta-galactoside binding lectin) chez des hémocytes de *C. virginica* adultes exposés au pathogène *Perkinsus marinus*. Chez la même espèce, deux gènes homologues aux récepteurs à lectines ont été identifiés par Jenny *et al.* (2002).

Le system pro-PO

Une autre voie importante dans la reconnaissance des corps étrangers est celle du système de la pro-phénoloxydase (système pro-PO). Le système pro-PO et les protéines qui lui sont associées sont impliqués aussi bien au niveau de la reconnaissance du « non-soi » que dans la communication cellulaire (Luna-Gonzalez *et al.*, 2003). Plus spécifiquement, l'activation de ce système est induite par des protéines liant spécifiquement des LPS, du peptidoglycane ou des (1,3)- β -D-glucanes. La forme active de la pro-PO, la phénoloxydase (PO) ou tyrosinase, va catalyser deux réactions successives. La première est l'hydroxylation du monophénole en O-diphénole et la seconde est l'oxydation de ce dernier en O-quinone (Iwanaga et Lee, 2005). La production de la O-quinone est l'étape initiale d'une cascade biochimique conduisant à la biosynthèse de la mélanine et à l'encapsulation des corps étrangers (Cerenius et Söderhäll, 2002; Iwanaga et Lee, 2005). Bien que plus étudiée chez les insectes, la PO a été l'objet de plusieurs travaux chez les bivalves adultes (Renwranz et Stahmer, 1986; Carballal *et al.*, 1997a; Lopez *et al.*, 1997; Deaton *et al.*, 1999; Luna-Gonzalez *et al.*, 2004). Au niveau larvaire et chez les juvéniles, l'activité de cette enzyme a été détectée chez *C. gigas* (Luna-Gonzalez *et al.*, 2004; Thomas-Guyon *et al.*, 2009), chez *M. edulis* (Dyrynda *et al.*, 1995) et chez *Argopecten ventricosus*, *Nodipecten subnodosus* et *Atrina maura* (Luna-Gonzalez *et al.*, 2003).

Les polypeptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont généralement des molécules cationiques à faible poids moléculaire (< 10kDA). On peut les classer en trois groupes majeurs : les peptides linéaires, les peptides contenant des résidus cystéines et des peptides avec un ou deux acides amines surreprésentés (Pro, Arg, Gly or His) (Brogden, 2005). Malgré leur

grande diversité, les PAM sont caractérisés par leur structure cyclique contenant des ponts disulfures intramoléculaires et leur haute teneur en acides aminés cationiques et hydrophobes (Bulet *et al.*, 2004; Jenssen *et al.*, 2006). Leur action dans les systèmes de défense immunitaire consiste à agir directement sur la membrane microbienne en interférant avec leur propriété de perméabilité (effet détergent) ou par des actions perforatrices (Shai, 2000). Chez certains insectes, ils peuvent également perturber la biosynthèse des membranes (Carlsson *et al.*, 1998). La libération des PAM est réalisée par les hémocytes lorsqu'ils sont en contact avec des LPS bactériens (Charlet *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 2000; Bachere *et al.*, 2004). Chez les mollusques, des PAM ont été identifiés chez *Dolabella auricularia* (Iijima *et al.*, 2003), chez *Mytilus edulis* (Charlet *et al.*, 1996) et *M. galloprovincialis* (Hubert *et al.*, 1996), chez *Argopecten irradians* (Zhao *et al.*, 2007), et chez les huîtres *C. virginica* (Seo *et al.*, 2005) et *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007a; Gueguen *et al.*, 2009). Chez les bivalves, les premiers peptides antimicrobiens ont été caractérisés chez les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (Charlet *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 2000). Chez *C. virginica* un PAM de type défensines ont été caractérisés (Seo *et al.*, 2005) et chez *C. gigas*, des approches en génomique ont permis de caractériser trois familles de défensine. Cg-def, exprimée dans le manteau (Gueguen *et al.*, 2006) et Cg-defh 1 et Cg-defh 2 isolées à partir d'hémocytes (Gonzalez *et al.*, 2007). L'étude de l'expression des gènes de Cg-def et de Cg-defh2 tout au long du développement larvaire de *C. gigas*, a montré que ces deux gènes étaient peu exprimés du stade zygote jusqu'au stade juvénile (Tirape *et al.*, 2007).

La poussée oxydative ou « oxydative burst »

La production de radicaux libres de l'oxygène est induite lors de la phagocytose par la fixation de corps étrangers à la surface de la membrane cytoplasmique des hémocytes (Figure 1.12). Ce processus est appelé poussée oxydative (« oxidative burst »). Les principales espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) générées pendant ce processus sont $O_2^{\cdot -}$, O_2 , OH^{\cdot} , NO , OCl^{\cdot} et H_2O_2 . Ces ROS sont des composés cytotoxiques dérivés de l'oxygène qui permettent l'élimination des corps étrangers (Babior,

1984; Beutler, 2004). Ces radicaux libres se retrouvent dans le phagosome fusionné avec les lysosomes. La réduction monovalente de l'oxygène en ROS est assurée par la NADPH-oxydase lorsque des antigènes étrangers sont attachés à la surface de la membrane cytoplasmique des hémocytes induisant une augmentation de la consommation en oxygène (Bergin *et al.*, 2005). De plus, lorsque les lysosomes fusionnent avec les phagosomes, la myéloperoxidase (MPO) est activée et produit de l'hypochlorite à partir du peroxyde d'hydrogène et des ions chlorure. L'hypochlorite est également toxique pour les corps phagocytés.

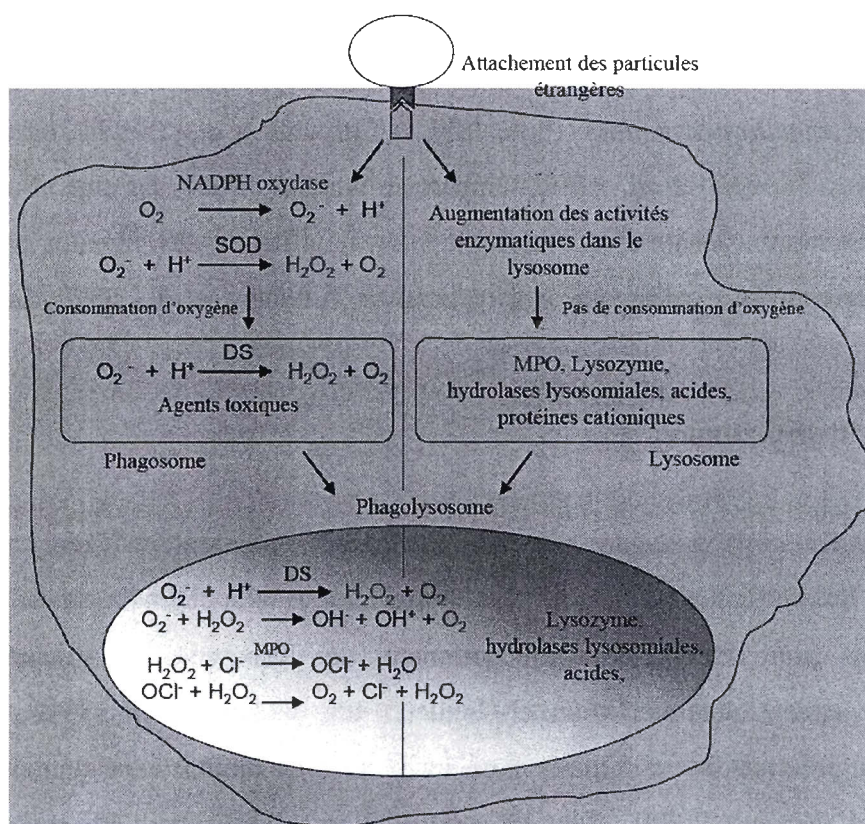


Figure 1.12. Représentation des processus de dégradation intracellulaire intervenant après phagocytose d'une particule étrangère par les hémocytes. NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase), SOD (Superoxyde Dismutase), DS (Dismutase Spontanée), MPO (Myéloperoxydase) (extrait de Tirapé, 2007).

L'augmentation de la quantité de ROS bien qu'utile pour l'élimination des corps étrangers, peut être aussi dommageable pour l'organisme lui-même s'ils ne sont pas pris en charge par les défenses antioxydantes (voir section « Stress oxydatif et défenses antioxydantes »). Bien que l'apparition de plusieurs pathologies chez les vertébrés soit associée à la surproduction de ROS et à une augmentation du stress oxydatif, la même situation chez les bivalves n'a pas encore été clairement établie. Cependant, lors d'infections bactériennes, la production de ROS a été mise en évidence chez plusieurs espèces de mollusques comme chez *C. virginica* (Anderson *et al.*, 1992; Bramble et Anderson, 1997), chez *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 1994; Greger *et al.*, 1995; Nakayama et Maruyama, 1998; Lambert *et al.*, 2003; Labreuche *et al.*, 2006), chez *O. edulis* (Bachère *et al.*, 1991), chez les moules *Mytilus edulis* et *galloprovincialis* (Pipe, 1992 ; Carballal *et al.*, 1997b), ou encore chez *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991; Lambert et Nicolas, 1998). De plus, il a été montré que les huîtres creuses sensibles à la mortalité estivale affichent des niveaux plus élevés en ROS comparativement à celles qui sont résistantes (Lambert *et al.*, 2007; Samain *et al.*, 2007).

Les enzymes hydrolytiques

L'élimination des corps étrangers nécessite également l'intervention d'enzymes capables d'hydrolyser des particules intra ou extracellulaires issues de la dégradation de ces derniers. Ces enzymes sont composées principalement de lysozymes, β -glucuronidases et phosphatases acide et alcaline (Moore et Gelder, 1985; Beckman *et al.*, 1992; Torreilles *et al.*, 1997). La présence de ces derniers dans les hémocytes adultes a été démontrée chez *C. gigas* (Xue et Renault, 2000), chez *M. edulis* (Pipe, 1990), chez *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a), et chez *Ruditapes decussatus* (Lopez *et al.*, 1997). Au niveau larvaire, une étude effectuée par l'équipe de Luna-Gonzalez *et al.* (2004) a permis de détecter l'activité de plusieurs enzymes hydrolytiques ainsi qu'une activité lysosomale chez des larves et des juvéniles de *C. gigas*. Ils ont pu mesurer l'activité de la *N*-acetyl- β -glucosaminidase, de l'acide phosphatase, de la β -glucuronidase et d'une estérase. La présence de chacune de ces enzymes est considérée comme étant caractéristique de

l'activité hémocytaire chez plusieurs bivalves adultes (Beckmann *et al.* 1992 ; Hine et Wesney, 1994 ; Carballal *et al.*, 1997a).

Les protéases et inhibiteurs de protéases

Le rôle des protéases et inhibiteurs de protéases a été bien caractérisé dans les réactions de la mélanisation, du système prophénoloxidase, et de la coagulation de l'hémolymphe chez les invertébrés (Soderhall et Cerenius, 1998; Kanost, 1999; Iwanaga and Lee, 2005). Les cathepsines sont des cystéines protéases lysosomales, impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que le remodelage des matrices extracellulaires, l'apoptose, la dégradation des protéines dans le lysosome (Frlan et Gobec 2006). Des EST de cathepsines ont été identifiés chez *C. virginica* (embryon et hémocytes) par Jenny *et al.* (2002) et dans des hémocytes exposés à des bactéries chez *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2003). Les inhibiteurs agissent contre les protéases de bactéries et de protozoaires pathogènes. Les protéases constituent de véritables facteurs de virulence chez les pathogènes leur permettant de s'introduire dans l'hôte et d'y proliférer (Labreuche *et al.*, 2006). Parmi les inhibiteurs de protéases, l' α 2-macroglobuline a la propriété d'inhiber la plupart des protéases en raison de son mode d'action de «piégeage» de ces dernières (Hibbets *et al.*, 1999). L' α 2-macroglobuline a été détectée chez l'huître *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2003). Un autre groupe d'inhibiteur de protéases est constitué des serpines (serine-protease inhibitor). Elles participent notamment à la régulation des protéases à sérine au cours de l'inflammation, et de la coagulation. Des serpines ont été décrites chez plusieurs invertébrés (*Cenorhabditis elegans*, *Tachypleus tridentatus*, et *Drosophila* sp., (Silverman *et al.*, 2001). Un ADNc de serpine a été identifié chez *C. gigas* mais à ce jour sa fonction n'a pas encore été définie (Gueguen *et al.*, 2003). La permine ou cavortine fait partie de cette famille de serine protéase. Découverte en premier chez la moule *Perna viridis* (Scotti *et al.*, 2001), la permine est une protéine non pigmentée, glycosylatée et exceptionnellement riche en histidine et en acide aspartique, deux acides aminés connus pour leur capacité à se lier avec des métaux cationiques divalent, principalement le Fe^{++} . De plus, la permine possède une séquence

homologue au domaine du site actif d'une Cu-Zn SOD (Scotti *et al.*, 2001). Toutes ces propriétés suggèrent que la pernine en plus d'être un protéase à serine, agit comme un chélateur de métaux et facilite l'activation des défenses antioxydantes (Scotti *et al.*, 2001). Gauthier et Vasta (Gauthier and Vasta, 1994) ont démontré la capacité de la pernine à inhiber la croissance de *P. marinus*. Tanguy *et al.* (2004) ont identifié un gène codant pour la pernine dans des hémocytes de *C. virginica* et ils ont observé une augmentation de l'expression de ce gène après 45 jours d'exposition à *P. marinus*, suggérant un rôle potentiel de la pernine dans la réponse à une infection parasitaire. De plus, Huvet *et al.* (2004) ont suggéré que la pernine pouvait agir comme agent de protection cellulaire contre des intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) chez *C. gigas* inoculée avec *Vibrio splendidus*. Enfin, les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP) ont pour rôle de réguler l'activité des métalloprotéases de la matrice extracellulaire et de ce fait interviennent dans la réparation tissulaire (Nagase et Woessner, 1999). Chez l'huître *C. gigas*, des gènes Cg-Timp ont été identifiés (Montagnani *et al.*, 2001, 2005). Ces auteurs ont montré que l'abondance des transcrits de ces gènes est fortement accrue dans des hémocytes en réponse à des injections de surnageant de cultures de *Vibrio* suggérant une implication dans la réponse à l'infection bactérienne chez l'huître. De plus, ils ont mis en évidence une accumulation des ARNs de Cg-timp dans des animaux en réponse à une lésion de la coquille, ce qui suggère que Cg-timp aurait un rôle dans les mécanismes de réparation liés au remodelage des matrices extracellulaires. L'activation et la régulation de Cg-Timp via la voie de signalisation NF- κ B lors d'infection bactérienne chez *C. gigas* ont été spécialement étudiées par Montagnani *et al.* (2007). La caractérisation de l'expression de Cg-Timp chez *C. gigas* pendant l'ontogénie ainsi que son activation suite à une stimulation bactérienne aux stades larvaires ont été effectués par Tirapé *et al.* (2007).

STRESS OXYDATIF ET DÉFENSES ANTIOXYDANTES

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'oxygène que nous respirons est une molécule constituée de deux atomes. L'orbitale la plus externe de chacun de ces atomes comporte six électrons célibataires de même spin ce qui limite la réactivité de la molécule. Les radicaux libres (ou espèces réactives) sont une forme particulière des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié). Le champ magnétique créé par la rotation, ou spin, de cet électron célibataire n'est donc pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules (Davies, 1995 ; Kohen et Nyska, 2002; Adly, 2010). La réactivité des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), comme le monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$) ne sont pas très réactifs mais constituent des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telle la vasodilatation capillaire (Adly, 2010). Par contre des radicaux comme les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) ou surtout le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) sont extrêmement réactifs, et ce, avec la plupart des molécules des tissus vivants (Adly, 2010). D'autres espèces dérivées dites espèces actives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ne sont pas des radicaux mais sont réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Davies, 1995).

Les sources de ROS

Les ROS ne sont pas seulement produits lors des réactions immunitaires. Les principales sources de ROS dans l'organisme sont les phosphorylations oxydatives (respiration cellulaire) où l'oxygène moléculaire peut être réduit de manière incomplète. Il

est bon de noter sur ce point que lorsque la demande énergétique augmente (comme c'est le cas lors des réactions immunitaires), l'activité respiratoire augmente également, ce qui induit une augmentation des ROS produits par les phosphorylations oxydatives. Parallèlement à cela, des ROS peuvent être formés par d'autres voies métaboliques. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont formés par les voies enzymatiques de détoxification, comme par exemple, par la xanthine oxydase et la cytochrome P450 (Davies, 1995). Les peroxydes organiques, une autre famille de ROS, sont des intermédiaires dans la synthèse des prostaglandines, des prostacyclines, des thromboxanes et des leucotriènes (Kohen et Nyska, 2002). Les métaux toxiques (chrome, vanadium) mais aussi le cuivre et le fer libres (métaux de transition) génèrent des radicaux libres (radicaux hydroxyles), très réactifs, à partir de l' H_2O_2 , par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Halliwell et Gutteridge, 1986).

Implication du stress oxydatif sur l'organisme

Les cellules des êtres aérobies, en état normal d'oxydoréduction, ont une concentration basale en radicaux libres. Le contrôle rigoureux de la formation et de l'élimination de ces derniers préserve les cellules des effets nuisibles des radicaux libres. On appelle stress oxydatif, une augmentation de radicaux libres de l'oxygène pouvant provoquer des dommages cellulaires irréversibles, tels que la peroxydation des lipides et la dénaturation des acides aminés et des bases azotées (Adly, 2010).

La peroxydation des lipides constitués d'acides gras polyinsaturés induit une désorganisation des structures membranaires entraînant le dysfonctionnement des protéines qui y sont imbriquées et une libération de pentane et d'aldéhydes (par ex. la malondialdéhyde) qui, à fortes concentrations, s'avèrent toxiques pour la cellule (Del Rio *et al.*, 2005). La dénaturation oxydante des acides aminés conduit à une déstabilisation des structures secondaires et tertiaires des protéines, ainsi qu'à l'inactivation des enzymes. La modification des bases azotées par les radicaux libres de l'oxygène provoque, quant-à-elle, un arrêt ou une aberration de l'expression du message génétique dans la cellule (dommage à l'ADN). Dans la majorité des cas, l'augmentation de la teneur cellulaire en radicaux libres

de l'oxygène provient d'une production exagérée que les systèmes antioxydants ne sont pas capables de gérer (Kohen et Nyska, 2002).

Les systèmes antioxydants

Le maintien de niveaux non-cytotoxiques en ROS est assuré par deux catégories de défenses antioxydantes : les systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques.

Deux catégories d'enzymes forment la clé de voûte de ce système antioxydant. Il s'agit des superoxydes dismutases (SOD) qui transforment les anions superoxydes en peroxydes d'hydrogène et des peroxydases qui dégradent les peroxydes en eau. Les principales sont la catalase (CAT), glutathione peroxydase (GPX) et les peroxyrédoxines (PRDX). L'étude de l'activité de ces enzymes a souvent été utilisée dans un cadre écotoxicologique ou pour mettre en avant l'impact des variations des concentrations en oxygène du milieu chez les bivalves adultes (Manduzio *et al.*, 2005).

Les superoxydes dismutases (SOD)

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase est une enzyme qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène :



L'action oxydante de l'anion superoxyde est assez faible. Cependant, il peut générer des radicaux plus réactionnels. Le SOD s'attaque donc à ce produit pour arrêter à la base les réactions en chaîne. La famille de la SOD est formée de trois formes métalliques. Une forme contient du fer (III) sur son site actif; c'est le superoxyde dismutase ferreux (FeSOD). Une deuxième forme, appelée MnSOD, contient du manganèse (III). Enfin, une troisième forme (Cu/ZnSOD) comprend du cuivre (II) et du zinc (II) au site actif (Kohen et Nyska, 2002). L'activité de ces classes de SOD en relation avec la disponibilité en oxygène a été étudiée dans les hémocytes de *Chamelea gallina* (Monari *et al.*, 2005). Dans cette étude, il a été montré que l'activité des SOD hémocytaires (Cu/ZnSOD et MnSOD)

diminue en condition anoxique. Un autre travail intéressant a mis en avant l'existence d'une SOD extracellulaire (Cg-EcSOD) qui se lie spécifiquement avec les LPS (Gonzalez *et al.* 2005). Une séquence d'une SOD a pu être mise en évidence chez *C. gigas* dans les travaux de Guegen *et al.* (2003).

La catalase (CAT)

C'est une peroxydase tétramérique, d'un poids moléculaire d'environ 240 kDa, formée de quatre sous unités identiques. Elle possède un hème responsable de son activité catalytique. On la trouve principalement dans les peroxysomes. Elle est induite par les agents inducteurs de la prolifération des peroxysomes. Comme chez toutes les peroxydases hémiques, le substrat oxydant de cette enzyme est le peroxyde d'hydrogène (Kohen et Nyska, 2002). La réaction catalysée par cette enzyme est donc la suivante :

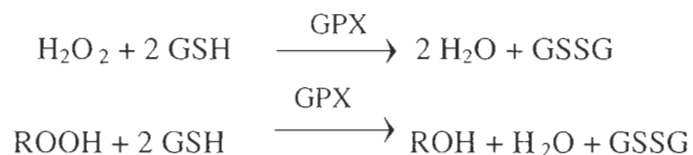


Cette enzyme existe chez tous les organismes aérobies, aussi bien les eucaryotes que les procaryotes (Harris, 1992). La séquence du gène de la catalase est disponible pour *C. virginica* (Cunningham *et al.*, 2006).

Les glutathion peroxydases (GPX)

La glutathion peroxydase permet l'élimination des peroxydes d'hydrogène et des hydroperoxydes (ROOH) présents dans le cytosol ou dans les mitochondries des cellules, en oxydant le glutathion (GSH) en bisulfure (GSSG). Les GPX (six familles) sont divisées en deux groupes selon qu'elles soient ou non dépendantes du sélénium (Se). Parmi les seleno-dépendantes (Se-GPX), on distingue aussi la forme classique qui se trouve dans le cytosol et dans les mitochondries et une forme associée aux membranes, capable de réduire les hydroperoxydes lipidiques membranaires (Margis *et al.*, 2008). Le site actif des Se-GPX comporte une sélénocystéine (Ursini *et al.*, 1985; Margis *et al.*, 2008).

La réaction des GPX avec les peroxydes est décrite comme suit :



La disponibilité du glutathion réduit (GSH) étant primordiale pour la réduction des peroxydes par les GPX, les molécules de glutathion disulphide (GSSG) issues de l'activité de ces dernières peuvent être réduits à nouveau par la glutathion-réductase (GR) qui utilise du NADPH. La majeure partie du NADP⁺ ainsi produit sera réduite à nouveau en NADPH à l'aide de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (voie du pentose phosphate). La réaction suivante illustre la régénération du glutathion par la GR :



Les peroxyrédoxines (PRDX)

Les peroxyrédoxines ou thiorédoxines réductases sont trouvées aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes. Leurs actions sont dirigées vers le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes. On en distingue six familles appelées PRDX 1 à 6 (Shuvaeva *et al.*, 2009). Les PRDX utilisent des cystéines actives pour réduire les peroxydes. On les subdivise généralement en deux catégories, les 1-cys et 2-cys PRDX selon qu'on a une ou deux cystéines impliquées dans la catalyse (Shuvaeva *et al.*, 2009). La réaction de peroxydation se déroule en deux étapes. La première est commune à toutes les formes et consiste en une réduction des peroxydes par la ou les cystéine(s). La deuxième comprend la régénération de la PRDX par des molécules contenant un groupement thiol (thiorédoxine, glutathion, ...). Cette deuxième étape peut se produire de trois manières différentes qui définissent trois classes de PRDX. Chacune de ces classes se caractérise par une manière différente de régénérer la PRDX. Dans ces systèmes, les composés contenant le groupement thiol doivent eux-mêmes être régénérés. Cette régénération nécessite l'action d'enzymes NADPH-dépendantes (Thiorédoxine réductase pour les thiorédoxines, glutathion réductase pour le glutathion,...) (Shuvaeva *et al.*, 2009). La surexpression des

gènes associés aux PRDX simultanément à une augmentation de stress oxydatif a été démontrée dans plusieurs états pathologiques, suggérant l'importance du rôle des PRDX dans la survie des cellules (Shuvaeva *et al.*, 2009). De plus, la PRDX6 est connue pour catalyser la réduction des peroxydes organiques tel que les lipides peroxydés (Manevich *et al.*, 2009; Shuvaeva *et al.*, 2009). Enfin, Chuchalin *et al.* (2003) ont démontré l'adaptation de la PRDX6 aux ROS produits par l'activité du métabolisme énergétique. Les travaux de David *et al.* (2005a) ont pu mettre en avant la surexpression d'un gène associé à une PRDX6 lorsque *C. gigas* est exposé à des conditions hypoxiques.

Le système antioxydant non-enzymatique

Le système non-enzymatique implique des antioxydants qui préviennent l'initiation et la prolifération des ROS qui ont échappé à l'action du système enzymatique. Ce système comprend plusieurs substances hydro- ou liposolubles et des composés qui préviennent la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (fer divalent, cuivre monovalent) susceptibles de les générer via les réactions de Fenton et de Haber-Weiss.

Dans les composés liposolubles, on trouve les vitamines (A, D, E et K). L'*alpha*-tocophérole ou vitamine E, est sans doute la vitamine la plus étudiée dans un contexte de stress oxydatif. Elle agit exclusivement dans un environnement lipophile, tel que la membrane biologique. L'étude de l'importance du contenu en vitamines pendant les stades larvaires et lors des cycles reproducteurs a été faite chez *P. maximus* et *C. gigas* (Seguineau *et al.*, 1996; Seguineau *et al.*, 2001).

Lors des réactions immunitaires, les ROS produits peuvent réagir avec les métaux de transition et former des composés encore plus dommageables pour l'organisme. La gestion de ces métaux est assurée par les molécules chélatrices. Les métallothionéines (MT) font partie de ces composés qui ont été largement étudiés chez les bivalves. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (6-7kDa) contenant une grande proportion de groupements thiols. La caractérisation de ces MT a été faite chez *C. gigas* (Tanguy et Moraga, 2001; Tanguy *et al.*, 2001), chez *C. virginica* (Jenny *et al.*, 2006) et chez *O. edulis*

(Tanguy *et al.*, 2003). La caractérisation des MT a été faite dans le cadre de la détoxification aux métaux lourds (Tanguy *et al.*, 2002). L'implication des MT dans les défenses immunitaires a été mise en avant dans les travaux de Jenny *et al.* (2006) chez *C. virginica* où les MT étaient exprimées aux stades larvaires. De plus, ils ont observé que la Cv-MT-III (isoforme de la MT) était plus exprimée chez les larves que chez les adultes.

Les protéines de stress

Les « Heat Shock Proteins » (HSP) peuvent s'avérer intéressantes dans un contexte de stress et d'immunité. Les différents membres de cette famille (HSP90, 70, 60, ...) sont des protéines de réponse au stress impliquées dans la cytoprotection. Ce sont des protéines chaperones qui interviennent dans la stabilisation de la structure des protéines néo-synthétisées ou dans le transport de ces mêmes protéines sous une forme active ou inactive dans les différents compartiments cellulaires (Boutet *et al.*, 2003). En condition de stress, elles se lient avec les polypeptides endommagés ou mal formés puis facilitent leur réparation ou leur dégradation (Lindquist and Craig, 1988; Huang *et al.*, 2001; Daugaard *et al.*, 2007). Les HSP semblent aussi réguler les défenses antioxydantes (Guo *et al.*, 2007). Ces molécules ont été étudiées chez *C. gigas* (Boutet *et al.*, 2003) et chez *M. galloprovincialis* (Cellura *et al.*, 2007). Leur implication dans l'induction des hémocytes a été mise en avant dans les travaux de Lacoste *et al.* (2001) et de Cellura *et al.* (2007). Une augmentation du niveau de HSP70 a été observée dans plusieurs tissus de poisson exposés à des pathogènes bactériens (Ackerman and Iwana, 2001; Deane *et al.*, 2004). Chez les bivalves, des études ont montré que l'expression de la HSP70 augmente dans les hémocytes de *C. virginica* après une exposition à *Perkinsus* (Brown *et al.*, 1993). Des observations similaires ont été faites chez le pétoncle infecté par *Vibrio anguillarum* (Song *et al.*, 2006).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Ce projet de recherche a pour objectif principal de documenter les changements physiologiques associés aux phénomènes de mortalités en éclosion chez deux espèces

d'huîtres. Pour cela, la thèse a été axée autour de deux expériences principales impliquant chacune une espèce d'huître d'intérêt commercial, l'huître américaine (*Crassostrea virginica*) pour la première et l'huître creuse ou du pacifique (*Crassostrea gigas*) pour la deuxième. Le fait d'avoir travaillé sur deux espèces différentes d'huîtres s'explique en raison des emplacements où les expériences ont été effectuées. En effet, la première expérience s'est déroulée à l'institut de recherche des zones côtières (IRZC) de Shippagan (NB, Canada) où seule l'huître américaine est cultivée, alors que la deuxième expérience a été effectuée dans les locaux de l'IFREMER à Brest (France) où seule l'huître du pacifique est étudiée. Dans chacune de ces expériences, les larves ont été mises en culture dans des environnements bactériens différents. La première expérience avait pour objectif de suivre le développement de larves d'huîtres américaines cultivées en présence ou non d'un antibiotique non-sélectif (chloramphénicol). L'antibiotique a été utilisé dans cette expérience pour pouvoir générer des environnements bactériens différents, l'un où la charge et la prolifération bactérienne est limitée par le traitement à l'antibiotique, et l'autre où les bactéries peuvent se développer sans contraintes. Dans la deuxième expérience, l'environnement bactérien des larves a été modifié par l'ajout ou non d'un pathogène connu dans les bassins de culture (challenge bactérien). Ce type d'expérimentation a été utilisé afin de pouvoir caractériser l'impact à court terme d'une exposition à un pathogène sur l'état physiologique de larves d'huîtres du pacifique. Dans les deux expériences, la physiologie larvaire a été abordée via l'étude du contenu en lipides, le métabolisme, le stress cellulaire et l'immunité, grâce à une approche multidisciplinaire comprenant des analyses enzymologiques, biochimiques et moléculaires. De plus, afin d'avoir une vision globale de la qualité de l'élevage, ces analyses ont été complétées par des mesures des taux de survie, de croissance et des niveaux d'alimentation. Enfin, des analyses microbiologiques ont également été effectuées pour caractériser l'environnement bactérien. Les deux expériences, concernent spécifiquement des stades de développements précédant la métamorphose. Cela s'explique pour deux raisons. La première est liée au fait que la période avant la métamorphose est connue pour être un moment critique du développement où l'apparition de fortes mortalités est fréquente. La seconde est purement zootechnique car

nous avons voulu éviter toutes les contraintes liées à la métamorphose chez les espèces d'huîtres, c'est-à-dire la récolte et le transfert des larves fixées. Pour chacune des deux expériences, nous nous étions fixés les objectifs décrits ci-dessous.

Expérience 1:

Objectif principal :

« Utiliser une approche multidisciplinaire de la physiologie pour évaluer le développement larvaire en fonction d'un traitement au chloramphénicol chez *C. virginica* »

Objectifs spécifiques :

1. Caractériser l'impact du chloramphénicol sur l'évolution de l'environnement bactérien (analyses microbiologiques).
2. Évaluer l'impact de l'utilisation du chloramphénicol sur la survie, la croissance et l'activité alimentaire des larves (performance larvaire).
3. Caractériser le développement et l'état physiologique des larves en fonction du traitement à l'antibiotique via l'étude du contenu en lipides, du métabolisme, du stress oxydatif et de l'immunité.
4. Interpréter les résultats obtenus au regard de l'évolution de l'environnement bactérien et de la performance larvaire.
5. Comparer les résultats entre les différents niveaux d'analyse afin de faire des corrélations entre les résultats enzymologiques, biochimiques et génomiques.

Expérience 2:

Objectif principal :

« Utiliser une approche multidisciplinaire pour évaluer l'impact d'une exposition à court terme à un pathogène sur la physiologie larvaire chez *C. gigas* »

Objectifs spécifiques :

1. Valider la présence et la persistance dans le temps du pathogène dans l'environnement des larves challengées et évaluer l'impact de celui-ci sur la structure de l'environnement bactérien (analyses microbiologiques).
2. Évaluer l'impact du challenge bactérien sur la survie, la croissance et l'activité alimentaire des larves (performance larvaire).
3. Caractériser l'impact du challenge bactérien sur l'état physiologique des larves via une approche statistique multivariée incluant toute les analyses effectuées dans l'approche multidisciplinaire.
4. Comparer les résultats entre les différents niveaux d'analyse afin de faire des corrélations entre les résultats enzymologiques, biochimiques et génomiques.

Les résultats obtenus dans ce projet de thèse ont été regroupés en trois chapitres. Le premier chapitre regroupe les résultats obtenus pour les analyses biochimiques et enzymologiques de la première expérience. Le deuxième présente les résultats génomiques de la première expérience et expose les points de comparaison avec les observations faites dans le premier chapitre. Enfin, le troisième chapitre regroupe tous les résultats obtenus pour l'expérience du challenge bactérien.

Chapitre 1

Changements physiologiques et biochimiques associés à l'apparition d'une mortalité de masse chez des larves d'huître américaine

Crassostrea virginica

Ce premier article, intitulé « Physiological and biochemical changes associated with massive mortality events occurring in larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*). », a été co-rédigé par moi-même, mon directeur Réjean Tremblay, mes codirecteurs Fabrice Pernet et Karine Lemarchand, ainsi que par les chercheurs Pierre Boudry et Dario Moraga. Il a été accepté dans *Aquatic Living Resources* et est paru dans le numéro 24 aux pages, 247–260 (2011). Ma contribution à ce travail a été l'essentiel des échantillonnages, des analyses et des statistiques ainsi que l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article. Réjean Tremblay et Fabrice Pernet ont fourni l'idée originale et conçu le plan de l'étude, et ont aussi aidé à la coordination de la recherche et à l'écriture du manuscrit. Karine Lemarchand, Pierre Boudry et Dario Moraga ont aidé pour la révision de l'article. Tous les auteurs ont lus et approuvés le manuscrit final. Des versions abrégées de cet article ont été présentées à la conférence de l'Aquaculture Association of Canada à Halifax (Canada) en 2006 et au 3^{ème} colloque international de Physiomar en 2008 à Brest (France). Une affiche reprenant l'essentiel des résultats a été présentée à la réunion annuelle du Réseau aquaculture Québec (RAQ) en 2008 à Québec (Canada).

RÉSUMÉ

Dans ce papier, des analyses biochimiques et physiologiques ont été utilisées pour caractériser les changements associés avec l'émergence d'une mortalité de masse apparue lors du développement pré-métamorphique de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*. Les analyses biochimiques comprenaient l'évaluation du contenu des classes de lipides, en acides gras et en protéines. La physiologie larvaire a été évaluée à travers l'activité alimentaire, l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique, le niveau de stress oxydatif et l'activité des enzymes antioxydantes. Ces analyses ont été complétées par une étude des communautés bactériennes ainsi que par une estimation de la performance larvaire. Nous avons observé que l'apparition de la mortalité coïncidait avec (1) des changements importants de la structure des communautés bactériennes entourant les larves, (2) une diminution progressive de l'activité alimentaire, (3) des niveaux plus importants de certaines classes de lipides (acides gras libres, diglycérides, phospholipides acétone mobile), (4) un contenu plus faible en phospholipides et en protéines, (5) un contenu plus élevé en acides gras non-méthylés interrompus diéniques (22:2 NMI), (6) une diminution de l'activité du métabolisme énergétique (activité de la citrate synthase et de la cytochrome oxydase), (7) un stress oxydatif plus important (niveau de peroxydation des lipides), et (8) une activation des défenses antioxydantes avant l'apparition de la mortalité (glutathionne peroxydase et superoxyde dismutase). Nous avons émis l'hypothèse que l'apparition de la mortalité était liée à une consommation d'énergie plus élevée couplée avec la diminution progressive de l'activité alimentaire, induisant une consommation des réserves énergétiques et une diminution de l'activité du métabolisme énergétique. De ce fait, la faible disponibilité en énergie a limité l'efficacité des défenses antioxydantes et donc, a induit une augmentation du stress oxydatif.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES ASSOCIATED WITH MASSIVE MORTALITY EVENTS OCCURRING IN LARVAE OF AMERICAN OYSTER (*CRASSOSTREA VIRGINICA*)

Bertrand Genard¹, Fabrice Pernet^{2, 3}, Karine Lemarchand¹, Pierre Boudry⁴, Dario Moraga⁵ and Réjean Tremblay¹

¹ Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310, allée des Ursulines, Rimouski, Québec G5L 3A1, Canada

² Institut de Recherche sur les Zones Côtières, 232b rue de l'Église, Shippagan, Nouveau-Brunswick E8S 2L7, Canada

³ Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc Roussillon, Bd Jean Monnet, 34200 Sète, France

⁴ Ifremer, UMR M100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Technopole de Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

⁵ Institut Universitaire Européen de la Mer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

Keywords: *Crassostrea virginica*, massive mortality, larvae, microbial environment, lipid, fatty acids, energy metabolism, oxidative stress, antioxidant enzymes.

Abstract

In this paper, biochemical and physiological analyses were used to characterize changes associated with mortality event occurred during veliger development of American oyster, *Crassostrea virginica*. Biochemical analyses included the evaluation of lipid classes, fatty acid composition and total protein content. Larval physiology was evaluated by studying feeding activity, enzymes related to energy metabolism, oxidative stress levels and enzymatic antioxidant defenses. These analyses were complemented by bacterial community analyses as well as by measuring larval oyster performance. We observed that mortality events coincided with (1) strong changes in the surrounding bacterial community; (2) a progressive decrease in feeding activity; (3) higher levels of some lipid classes (free fatty acids, diglycerides, and acetone mobile phospholipids); (4) lower levels of phospholipids and protein; (5) higher contents of non-methylene interrupted dienoic fatty acids (22:2 NMI); (6) a decrease in energy metabolism activity (citrate synthase and cytochrome oxidase activities); (7) a higher oxidative stress (lipid peroxidation level); and (8) an activation of antioxidant defences before mortality (glutathione peroxidase and superoxide dismutase). We hypothesized that mortality emergence was related to higher energy consumption coupled with the progressive decline in feeding activity, lowered energy reserves and a decrease in energy metabolism activity. Thus, the low energy availability limited the efficiency of antioxidant defenses, resulting in a higher oxidative stress.

Introduction

In bivalve aquaculture, mass mortality of larvae is a regular event. The origin of this phenomenon can be multifactorial, including abiotic and/or biotic factors (Paillard et al. 2004). In hatchery, it is often associated with the degradation of rearing environment. In bivalves larvae, the physiological, and biochemical changes associated with the emergence of mortality event are poorly documented. Therefore, firstly in this project, biochemical and physiological parameters involved in larval development success and/or stressful condition were studied in relation to mortality occurrence.

Development success in larval bivalves is related to their capacity to accumulate lipids, which are essential to sustain larval growth and survival (Holland and Spencer 1973; Delaunay et al. 1992). A previous study on sea scallop larvae showed that levels of triacylglycerol (TAG), which constitutes the main energy source during larval development, are higher in animals treated with an antibiotic than in non-treated controls, where significant mortality occurred (Pernet et al. 2006a). In regard of these studies, we hypothesized that the lipid class composition in larvae is a good indicator of energy acquisition and overall health of larvae.

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) are essential for sustaining growth and improving survival in several bivalve species (Langdon and Waldock 1981; Delaunay et al. 1993). C20 PUFAs, such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and arachidonic acid (ARA, 20:4n-6), are precursors of eicosanoids, a group of highly biologically active hormones that includes prostaglandins, leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acids (Smith and Murphy 2003). Eicosanoid production is associated with stressful situations, with excess eicosanoid production having been recorded under pathological conditions (Bell and Sargent 2003). ARA levels in sea scallop show a marked increase during the metamorphic stage, which coincides with elevated mortality and the establishment of pathogenic and opportunistic microbes in larval cultures (Pernet et al. 2005). Therefore,

fatty acid composition, and more particularly ARA, is an indicator of health in marine larvae.

Larval development could be evaluated by the abilities of larvae to transform energetic substrates in ATP. Given that ATP formation involves mainly the aerobic oxidation of lipids, proteins and carbohydrates in mitochondria by means of enzymatic complexes of the citric acid cycle and electron chain transport, the energetic status of oyster larvae can be evaluated by measuring the activities of key enzymes like citrate synthase (citric acid cycle) and cytochrome c oxidase (electron chain transport) (Garcia-Esquivel et al. 2002; Moran and Manahan 2004). Here we hypothesize that the activities of key enzymes associated with physiological energy reserves and feeding activity in larvae reflect the organism maintenance cost and energy acquisition.

Larval development success can also depend on accurate antioxidant defenses. Dandapat et al. (2003) found that the antioxidant defenses play an important role in providing protection to the developing larvae from oxidative assault. Moreover, recent studies show that Pacific oysters infected with *Vibrio* exhibit an enhanced production of reactive oxygen species (ROS) by immunocompetent cells referred to as hemocytes (Labreuche et al. 2006a,b). These microbicidal oxygen derivatives could be detrimental to oyster cells, inducing oxidative stress and tissue peroxidation. To avoid these processes, ROS content are controlled by antioxidant defense systems. Oysters susceptible to summer mortalities exhibit a higher level of ROS compared to that of resistant animals before mortality event, thus linking mortality with the antioxidant disorder of the sensitive oysters (Lambert et al. 2007; Samain et al. 2007). Therefore, we hypothesize that the estimation of the antioxidant enzyme activities is a useful tool to monitor the oxidative stress associated with massive mortality emergence.

The objectives of the current paper were to estimate changes associated with massive mortality emergence by studies of (1) larval growth and survival, (2) bacterial environment, (3) the protein, lipid class and fatty acid content of larvae, (4) energetic metabolism and (5) antioxidant defenses and lipids peroxidation of larvae.

Materials and methods

Rearing procedures

This work was conducted at the Coastal Zone Research Institute (CZRI) hatchery in Shippagan (New Brunswick, Canada) and took place from mid-January to February 2006. Adult oysters were collected at an aquaculture grow-out site in Bouctouche (New Brunswick, Canada; 46°49'N, 64°07'W) and placed in 240 L tanks in the laboratory. Temperature was gradually increased from -1°C to 20°C over a period of 20 days and maintained for another four weeks with the continuous addition of food (three microalgae species: *Isochrysis sp.* [T-ISO], [MONO *Pavlova lutheri*] and *Chaetoceros muelleri* [CHGRA] in equal proportions). When males and females reached sexual maturity, spawning was induced by thermal shock and the fertilized eggs were transferred to a 415 L Xactic™ tank for 24 h at 20°C (10 eggs mL^{-1}). Larvae (10 ind. mL^{-1} initially) were reared in the same kind of Xactic tank at 15°C in filtered seawater (double cartridge-filtered: 1 μm and 0.5 μm) with gentle aeration. Larvae were fed a mixture of MONO, T-ISO and CHGRA at 35×10^3 algal cells mL^{-1} . Algae were batch-cultured in f/2 medium (with no Si for flagellates; Guillard 1975) at 20°C and under continuous illumination in 25 L carboys continuously supplied with CO_2 to maintain pH between 7.5 and 8.

Experimental design

Two days after fertilization, D-stage larvae were collected on a 44 μm square mesh filter, visually counted (binocular) and divided equally into six Xactic tanks. Larvae were cultured in triplicate tanks ($\pm 3.5 \times 10^6$ larvae per tank) with or without an antibiotic (chloramphenicol at 4 mg mL^{-1} ; Fluka, Mississauga, ON). The antibiotic was used in this study to generate two different bacterial environments. Water renewal, food replacement and antibiotic treatment were conducted every 2–3 days. Samples for lipid, enzymatic and microbiological analyses were collected at 2, 6, 13, and 20 days post fertilization (dpf). Eggs were also collected for lipid analyses.

Larval performance

Shell length (SL), survival rate (% of live larvae based on initial number) and feeding activity (number of cleared algal cells per larvae per day) were determined in tanks at each water change. Sieved larvae were transferred into 20 L buckets. Three 1 mL subsamples of larvae were removed from each bucket and the concentration of live larvae was determined visually using a binocular microscope (Leitz Labovert, Wetzlar, Germany). SL was estimated with a Moticam 320 camera coupled to the binocular microscope; at least 50 live larvae per tank were measured to determine the mean SL using Motic Images and version 2.0 software (DC Imaging, California, USA). Microalgal cell consumption was measured with a Beckman-Coulter Z2 electronic particle counter using a 100 μm probe (Beckman, USA). After food delivery and homogenization, enriched seawater was sampled in triplicate in each tank to measure the initial cell concentration. An additional sample was taken the following day (± 24 h later) and food uptake (feeding activity) was evaluated as clearance rate = $(N_{t=0} - N_{t=24}) / \text{number of live larvae per mL}$, where N is the concentration of microalgal cell per mL introduced ($t=0$) and after 24 h ($t=24$).

Lipid class and fatty acid analyses

Microalgae and larvae were filtered onto 450°C pre-combusted GF/C filters and stored in dichloromethane under a nitrogen atmosphere at -80°C until extraction by the method of Folch et al. (1957) as described by Pernet et al. (2005). Lipid classes were determined using S-III chromarods and a flame ionization detection system (FID; Iatroscan MK-6S, Iatron Laboratories Inc., Tokyo, Japan) as described by Parrish (1999). This method separates aliphatic hydrocarbons, sterol and wax esters, ketones, triacylglycerols, free fatty acids, free fatty alcohols, free sterols, diacylglycerols, acetone mobile polar lipids and phospholipids.

Fatty acid profiles of microalgae and larvae were determined by gas chromatography. Neutral and polar fractions were extracted by column chromatography on deactivated silica (Pernet et al. 2006b). Fatty acid methyl esters (FAME) from polar lipids were prepared

using 2% H₂SO₄ in methanol following Lepage and Roy (1984). FAME were analyzed with a GC-FID (model 8610C, SRI, Torrance, CA, USA) equipped with a DB-WAX column (polyethylen glycol, 30 m × 0.25 mm DI × 0.25 μm; Agilent). Hydrogen was used as the carrier gas and samples were injected directly onto the column. FAME were identified by comparison of retention times with known standards (37 component FAME mix, Menhaden fish oil; Supelco, Bellefonte, CA, USA).

Chromatograms were analyzed using Peak Simple version 3.21 (SRI). The peroxidation index (PI) of polar lipids was calculated as $PI = 0.025 (\% \text{ monoenoics}) + 1 \times (\% \text{ dienoics}) + 2 \times (\% \text{ trienoics}) + 4 \times (\% \text{ tetraenoics}) + 6 \times (\% \text{ pentaenoics}) + 8 \times (\% \text{ hexaenoics})$.

Bacterial analyses

Bacterial analyses were carried out by the Research and Productivity Council (RPC) laboratory in Fredericton (NB, Canada). Samples of oyster larvae were collected in tubes containing 3 mL of the nucleic acid fixative RNAlater (Ambion) and stored at 4°C according to RPC recommendations; these samples were used for the characterization of the total bacterial community associated with the larvae using the method employed by Griffiths et al. (2001). Details of the protocol used by the RPC laboratory are available in Plante et al. (2007). Briefly, the microbial community was analyzed after DNA extraction by polymerase chain reaction (PCR) followed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) using 16S rDNA gene primer sets (p515f: gccagcagccgcggtaa; *E. coli* position 515–533; p806r: ggactaccagggtatctaata; *E. coli* position 806–787) for the PCR. The DGGE was performed with a gradient of 40–70% urea–formamide mixture and a non-denaturing 4% acrylamide stacking gel. The number of bands, corresponding to different operational taxonomic units (OTU), was determined visually for each sample. A similarity matrix using Jaccard's distance index (Sjaccard) was used to compare the fingerprints. To compare the positions of each band between gels, the ratio of the distance of sample migration to the last ladder band migration was calculated (R_f value).

The Jaccard index was calculated as $S_{jaccard} = NAB / (NA + NB - NAB)$, where NAB is the number of similar bands between samples A and B; NA or B is the sum of all bands in sample A or B. In addition cultivable bacterial and the presumptive *Vibrio* load in larval tanks were estimated by mean colonies counts on Marine agar 2216 E (Difco) and TCBS agar (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose, Difco) plate respectively. For this, water tank samples were serially diluted 10-fold and colonies were counted after incubation for 24h for TCBS agar and 72h for Marine agar at 20°C.

Spectrophotometric analyses

At each sampling time, 150000 to 75000 (depending to ontogenic stage) larvae were collected per tank on a 44 μm square mesh filter and stored at -80°C . Samples were weighed and homogenized (w/v=1/5) in phosphate buffered saline (PBS: 80 mM; pH 7.6 at 25°C) with 0.1% (v/v) triton X-100 in a glass Potter homogenizer in an ice bath. A fraction (50 μL) of the homogenate was removed and stored at -80°C for protein concentration determination using Bradford method (Protein assay Kit, Biorad). The remaining homogenate was centrifuged (15,000 g) at 4°C for 10 min and the supernatant was stored at -80°C then used for enzyme activity assays as well as for the analysis of the malondialdehyde (MDA) contents. Five enzymes were selected, two to investigated the activity of energetic metabolism (citrate synthase, cytochrome c oxidase) and three to monitor the antioxidant properties (glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase).

The citrate synthase (CS, EC 4.1.3.7) activity was analyzed using the method of Childress and Somero (1979). The assay reaction is based on the reaction of 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) with the reactive $-\text{SH}$ group of the free co-enzyme A. The 2-nitro (2-thiobenzoic acid) (NTB) produced is yellow and absorbs maximally around 412 nm. The cytochrome c oxidase (CCO, EC 1.9.3.1) assay is based on the oxidation of ferrocytochrome c and was monitored spectrophotometrically at 550 nm following the method of Yonetani (1967). For antioxidant enzymes, the catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activity was determined using the Amplex® Red Catalase Assay Kit (Invitrogen, USA) according protocol of the manufacturer. This commercial kit uses the horseradish

peroxidase (HRP)-catalyzed oxidation of 9-acetylresorufin to fluorescent resorufin with a maximal emission at 587 nm. Amplex Red reacts with H₂O₂ according to a strict stoichiometric ratio of 1:1. The glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) was assayed by the method of Paglia and Valentine (1967) using t-butylhydroperoxide (tBHP) as the substrate. GPX was estimated spectrophotometrically at 340 nm, measuring the consumption of NADPH necessary to regenerate glutathione (GSH) by glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2). The superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activity was measured spectrophotometrically according to the methods of McCord and Fridovich (1969) and Flohé and Ötting (1985). In this method, inhibition of the cytochrome c reduction rate is monitored at 550 nm at 25°C utilizing the hypoxanthine/xanthine oxidase (XOD) system as the source of superoxide (O₂[•]). SOD competes for O₂[•] and decreases the reduction rate of cytochrome c. Except for SOD where one unit of activity was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of cytochrome C reduction by 50%, enzyme activity was defined as pmol of substrate transformed per minute, expressed per larva or ng of protein. Oxidative stress was investigated through the lipid peroxidation levels using the malondialdehyde (MDA) content of larvae, MDA was measured with BIOXYTECHO MDA-586™ assay kits (Oxisresearch, Portland, Oregon, USA). This method is based on the reaction of a chromogenic reagent, N-methyl-2-phenylindole (R1, NMPI), with MDA at 45°C. Two molecules of N-methyl-2-phenylindole (NMPI) react with one molecule of malondialdehyde (MDA) to yield an intensely coloured carbocyanine dye with a maximum absorption at 586 nm.

Statistical analyses

Analyses were carried out using SAS® software (version 8.2). The significance value for all analyses was set at $p < 0.05$. A mixed model with repeated measures (time) was used to determine whether the effects of time, treatment (antibiotic or not) and interaction of both were significant between 6 and 20 dpf. Compound symmetry was used as a covariance structure. When differences were detected, LSMEANS a posteriori comparison tests were used. Residuals were graphically assessed for normality. Homogeneity was tested using the

O'Brien test. When normality and homogeneity precepts were not realized, data were log-transformed. Data are presented as means \pm standard deviations. Simple linear regressions were used to test mutual correlations between activities of CS, CCO, CAT, GPX and SOD, and between enzyme activities and MDA. Linear regressions were performed separately on data from untreated and antibiotic treated larvae. Nine points (n=9) were used for each regression, corresponding to the triplicate tanks at the three development times (6, 13 and 20 dpf). Regression were carried out using Sigma plot 8.0 (SYSTAT Software Inc, USA).

Results

Survival, growth and feeding activity

The survival rate was not significantly different between tanks during the first 17 days of the experiment, with a progressive decline from D-stage larvae to 17 dpf to reach values near 75% (Figure 2.1). At 20 dpf, a massive mortality occurred in untreated tanks, with a survival rate of $7 \pm 3\%$ compared to $66 \pm 5\%$ in the antibiotic treatment. Untreated and antibiotic treated larvae showed similar shell lengths, with an average growth rate of $\sim 5.4 \mu\text{m day}^{-1}$ between 6 and 20 dpf. Feeding activities were similar between treatments until 15 dpf and increased progressively with time. After 15 dpf, feeding activity patterns differed between untreated and antibiotic treated larvae (Figure 2.1). The feeding activity of untreated larvae decreased progressively and became null in moribund larvae at 20 dpf. In the antibiotic treatment, larvae showed an opposite trend: their feeding activity increased significantly between 17 and 20 dpf (Figure 2.1). Microscopic observations of moribund larvae at 20 dpf showed larvae weakly swimming in circles with their velum partially retracted or reduced followed by the appearance of ciliated protists.

Bacterial analyses

Significant interaction effect (p-value<0.0001) between time and treatment was found for the cultivable bacterial load. It increased significantly (p-value<0.05) between 13 and 20 dpf in the both treatments and were significantly lower (p-value<0.05) in tanks

treated with the antibiotic (Count in CFU mL⁻¹: antibiotic(13dpf) = $2 \pm 1 \times 10^3$; antibiotic(20dpf) = $13 \pm 5 \times 10^3$; untreated(13dpf) = $14 \pm 3 \times 10^3$; untreated(20dpf) = $82 \pm 8 \times 10^3$). Except in one tank at 20 dpf, no colonies were detected in TCBS plate for antibiotic treatment, while it increased significantly (p -value <0.05) between 13 and 20 dpf in untreated tanks (Count in CFU mL⁻¹: 13dpf = 13 ± 6 ; 20dpf = 1127 ± 500), illustrating that an increase of cultivable bacterial and presumptive *vibrio* content in untreated larval tanks coincided with the massive mortality emergence.

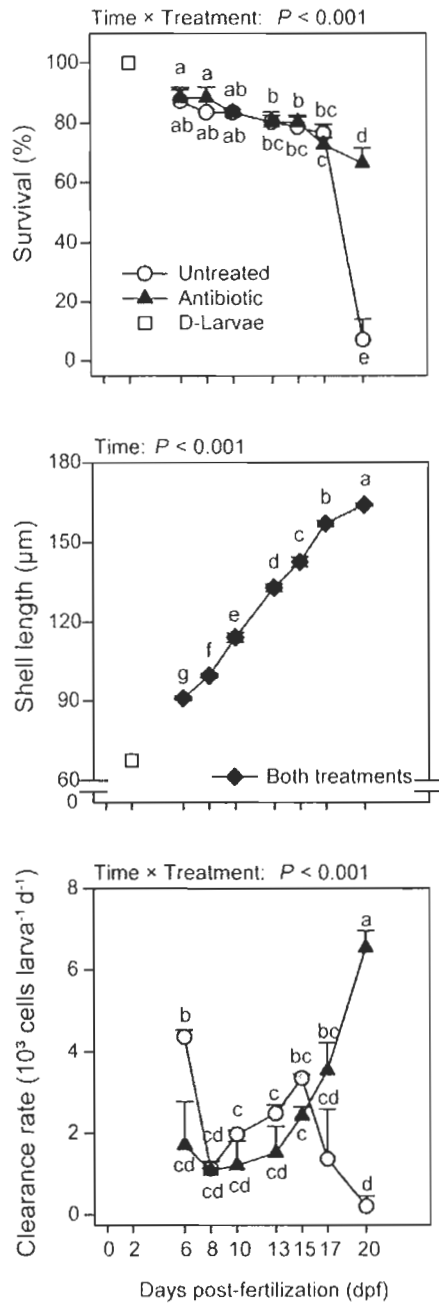


Figure 2.1. Survival, shell length and clearance rate for American oyster *Crassostrea virginica* larvae as a function of development time and seawater treatment. Seawater was untreated or treated with an antibiotic. Data from different treatments were pooled when this effect was not significant. Data are means \pm SD of three replicate tanks. Different letters indicate significant differences.

An examination of the Jaccard index (Sjaccard) showed that the similarity in the bacterial community between untreated and antibiotic treated larvae decreased progressively with time to reach the lowest value at 20 dpf (Sjaccard: 6 dpf = 74%, 13 dpf = 54%, 20 dpf = 16%).

Protein and lipid class contents

After fertilization, proteins were accumulated until 13 dpf at a rate of ~3.3 ng larva⁻¹ day⁻¹ to reach a mean value of 41 ng larva⁻¹ (mean for antibiotic treated and untreated larvae). At 20 dpf, protein content of untreated larvae remained constant whereas it continued to increase in antibiotic treated oysters until reaching 66 ng larva⁻¹ (Figure 2.2).

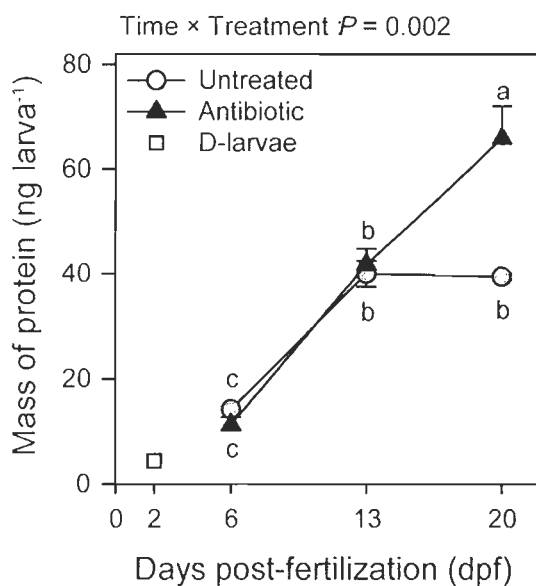


Figure 2.2. Mass of protein in American oyster *Crassostrea virginica* as a function of development time and seawater treatment. Seawater was untreated or treated with an antibiotic. Data are means \pm SD of three replicate tanks. Different letters indicate significant differences.

Independently of the antibiotic treatment, larvae showed consumption of TAG from egg reserves until 6 dpf followed by a stabilization until 13 dpf (Figure 3.3) and an increase at 20 dpf. While FFA and DG contributed <5% of the total lipids, their levels in antibiotic

treated and untreated larvae increased until the end of the experiment (Figure 3.3). FFA and DG concentrations were higher in moribund larvae than in antibiotic treated larvae at 20 dpf. AMPL, a lipid class that includes photosynthetic pigments, glycolipids and monoacylglycerol, was not significantly different during the first 13 days of development but was ~ 2 fold higher in untreated larvae than in larvae with antibiotic treatment when mortality occurred at 20 dpf (Figure 3.3). Finally, levels of ST and PL increased throughout larval development (Figure 3.3). However, at 20 dpf, PL accumulated at a lower rate in moribund larvae than in those treated with antibiotic, where no significant mortality occurred.

Fatty acid composition

Particular emphasis is given in this study to the major long-chain PUFAs 22:6n-3 (DHA), 20:5n-3 (EPA) and 20:4n-6 (ARA), which are commonly referred to as essential. Only ontogenetic effects were observed in the proportions of DHA and ARA (Table 2.1). After fertilization, DHA was accumulated until 13 dpf at a rate of $\sim 1.3 \pm 0.03\%$ day⁻¹ to reach a mean value of 16.9% (mean for both treatments in polar lipids). Following this period of accumulation, the DHA proportion decreased slightly (Table 2.1). Overall, levels of DHA in polar lipids of larvae were much higher than that of the diet. In contrast, EPA that had accumulated in egg membranes declined during the first two days of development after which this level was maintained at around 8% until 20 dpf, which is well below the level measured in the diet. The polar lipids of larvae were characterized by a period of enrichment in ARA during early development: between the egg and D-larva stages, ARA made up nearly 9% of the total fatty acids compared to 3.3% in the diet. After this period of accumulation, ARA was rapidly consumed, reaching a value between 2 and 4% of total fatty acids of polar lipids, which is below the level measured in the diet (Table 1).

Interestingly, development time and seawater treatment interacted in their effects on the non-methylene interrupted dienoic fatty acids (22:2 NMI), a group of long-chain PUFA naturally biosynthesized by mollusks. Overall, the level of 22:2 NMI increased by ca. 2×

during larval ontogeny from 2 to 20 dpf. However, 22:2 NMI was 12% higher in untreated oysters compared to that of animals treated with antibiotic at 20 dpf, when mortality

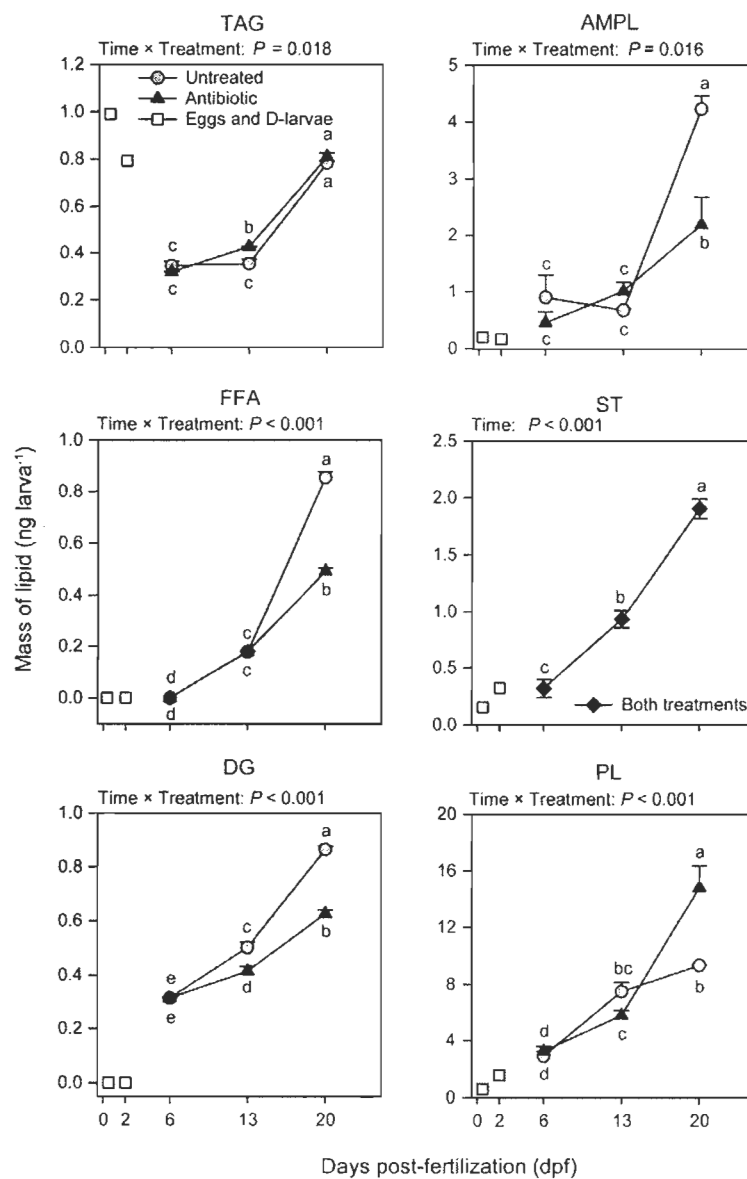


Figure 2.3. Lipid class composition of American oyster *Crassostrea virginica* as a function of development time and seawater treatment. Seawater was untreated or treated with an antibiotic. Data from different treatments were pooled when this effect was not significant. Data are means \pm SD of three replicate tanks. Different letters indicate significant differences. TAG = triacylglycerols, FFA = free fatty acids, DG = diacylglycerols, AMPL = acetone mobile polar lipids, ST = sterols, PL = phospholipids.

Table 2.1. Fatty acid composition (mass %) of polar lipids in American oyster *Crassostrea virginica* as a function of development time and seawater treatment.

Fatty acid	Diet	Eggs	D-larvae	6 dpf		13 dpf		20 dpf		P		
				Untreated	Antibiotic	Untreated	Antibiotic	Untreated	Antibiotic	Time	Treatment	Time × Treatment
14:0	15.4	3.4	2.6	5.2 ± 0.2	4.8 ± 0.9	2.7 ± 0.1	3.6 ± 0.2	2.3 ± 0.0	2.4 ± 0.3	< 0.001	0.280	0.119
16:0	11.5	21.8	23.0	19.4 ± 1.4	19.3 ± 0.4	16.2 ± 0.3	17.2 ± 0.5	17.2 ± 0.2	16.8 ± 0.3	0.003	0.896	0.246
18:0	1.9	3.7	3.9	3.4 ± 0.3	3.4 ± 0.1	3.8 ± 0.4	3.6 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.6 ± 0.5	0.001	0.382	0.748
∑ SFA	29.3	34.6	31.7	31.0 ± 1.3	32.2 ± 0.2	28.7 ± 0.4	29.4 ± 0.2	27.6 ± 0.9	28.6 ± 0.8	< 0.001	0.079	0.613
16:1n-7	16.7	1.5	1.9	3.7 ± 0.3	2.8 ± 0.9	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.3 ± 0.4	0.003	0.092	0.152
18:1n-7	1.5	2.5	3.6	3.7 ± 0.4	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.4	3.6 ± 0.3	4.7 ± 0.2	3.7 ± 0.3	0.036	0.077	0.051
18:1n-9	4.6	2.5	2.7	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.5	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.0	0.002	0.505	0.237
20:1n-5	0.0	0.6	1.6	2.4 ± 0.3	2.8 ± 0.6	3.3 ± 0.2	4.0 ± 0.6	2.6 ± 0.0	3.3 ± 0.4	0.007	0.059	0.893
20:1n-7	0.0	3.4	3.7	2.8 ± 0.2	3.0 ± 0.6	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.4	4.2 ± 0.2	4.0 ± 0.3	0.007	0.927	0.584
20:1n-9	0.0	0.5	0.0	0.3 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.7	0.366	0.024	0.954
20:1n-11	2.0	1.6	2.3	2.2 ± 0.4	2.3 ± 0.3	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.6	0.002	0.917	0.968
∑ MUFA	24.9	17.1	18.8	19.8 ± 0.6	21.1 ± 0.6	21.2 ± 0.6	22.3 ± 1.3	23.1 ± 0.0	21.9 ± 0.8	0.015	0.308	0.097
16:2n-6	2.9	0.0	0.0	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.8	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.007	0.336	0.510
18:2n-6	4.6	3.3	3.6	2.8 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.3	0.006	0.243	0.580
22:2 NMe ₂	0.0	4.5	5.4	7.0 ± 0.4	8.1 ± 0.5	9.8 ± 0.6	9.2 ± 0.6	11.6 ± 0.6	10.3 ± 0.6	< 0.001	0.419	0.003
18:3n-3	4.2	0.7	0.6	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.3	2.5 ± 0.1	1.6 ± 0.4	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.4	0.001	0.009	0.096
18:4n-3	5.9	0.0	0.5	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.001	0.859	0.243
20:3n-6	0.0	2.5	1.3	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.6	0.4 ± 0.4	0.037	0.215	0.095
20:4n-6 (AA)	3.3	7.1	8.8	3.6 ± 0.4	3.7 ± 0.4	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.4	2.9 ± 0.2	3.2 ± 0.2	0.001	0.260	0.386
20:5n-3 (EPA)	14.2	13.4	8.5	9.3 ± 1.1	7.7 ± 0.8	8.2 ± 0.1	8.0 ± 0.3	7.5 ± 0.4	8.1 ± 0.5	0.138	0.402	0.028
22:2n-6	0.8	3.3	0.9	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.004	0.614	0.851
22:5n-3	0.0	1.0	0.8	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.092	0.340	0.259
22:5n-6 (DPA)	1.5	3.3	4.3	3.7 ± 0.8	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.1	3.6 ± 0.2	2.9 ± 0.0	3.0 ± 0.3	0.094	0.900	0.567
22:6n-3 (DHA)	8.0	8.1	13.0	14.0 ± 0.3	13.8 ± 0.7	17.0 ± 0.1	16.8 ± 0.6	15.5 ± 0.1	16.3 ± 0.4	< 0.001	0.461	0.175
∑ PUFA	45.2	48.3	50.3	49.7 ± 0.4	47.5 ± 0.6	50.9 ± 0.3	49.5 ± 1.3	50.0 ± 0.9	50.3 ± 1.7	0.044	0.101	0.197
Peroxidation index	-	216	241	232 ± 1	219 ± 5	244 ± 2	241 ± 6	223 ± 5	236 ± 12	0.022	0.416	0.041

Seawater was untreated or treated with an antibiotic. Data are means ± SD of three replicate tanks. *P* values indicate the effect of development time and seawater treatment on each fatty acid (two-way ANOVAs). Significant probabilities are in bold (*P* < 0.05). Only fatty acids contributing >1% in at least one treatment combination are reported. dpf = days post-fertilization.

occurred ($P = 0.019$, Table 2.1). Finally, the peroxidation index of polar lipids was ca. 242 at 13 dpf independently of seawater treatment and decreased by 8.6% to 223 ($P = 0.017$) in untreated oysters at 20 dpf, when mortality occurred, reflecting peroxidation of membrane lipids. In contrast, the peroxidation index of oysters treated with the antibiotic remained stable between 13 and 20 dpf ($P = 0.476$, Table 2.1).

Enzyme activities and lipid peroxidation

We observed an interaction in the effects of time and seawater treatment on the activities of CS and CCO, two key enzymes of aerobic energy metabolism (Figure 2.4). In antibiotic treated oysters, CS and CCO activities increased markedly during larval ontogeny. In contrast, CS and CCO activities of animals maintained in untreated seawater increased until 13 dpf and decreased markedly (CS) or remained constant (CCO) when mortality occurred at 20 dpf. Therefore, both CS and CCO activities were lower in moribund larvae at 20 dpf compared to those of antibiotic treated oysters. Overall, CS activity was positively correlated with CCO irrespective of seawater treatment (Table 2.2). Normalization of activities of CS and CCO to protein content revealed different results: CS decreased markedly from 6 to 20 dpf irrespective of seawater treatment whereas CCO decreased from 6 to 20 dpf in untreated larvae only. In antibiotic treated oysters, CCO increased after 13 dpf (Figure 2.4).

There were also time and treatment interactions on the effects on CAT, GPX and SOD (Figure 2.5). When the massive mortality was observed, CAT and SOD activities were higher in larvae maintained in untreated seawater compared to those of antibiotic treated oysters. At 13 dpf, activities of GPX and SOD were higher in untreated larvae compared to that of treated oysters, suggesting an activation of antioxidant defenses before the mortality event in untreated tanks. Overall, antioxidant activities increased during larval ontogeny. Energy metabolism was positively correlated with antioxidant activities in antibiotic treated larvae (Table 2.2). When results were normalized to protein content, we observed that CAT, GPX and SOD activities increased with time in larvae maintained in untreated water. In antibiotic treatment, only GPX showed an increase between 13 and 20

dpf. Moreover, we observed treatment effect on CAT, GPX and SOD at 20 dpf where higher activities were measured in animals reared in untreated water. Similar treatment effect was found for GPX and SOD at 13 dpf.

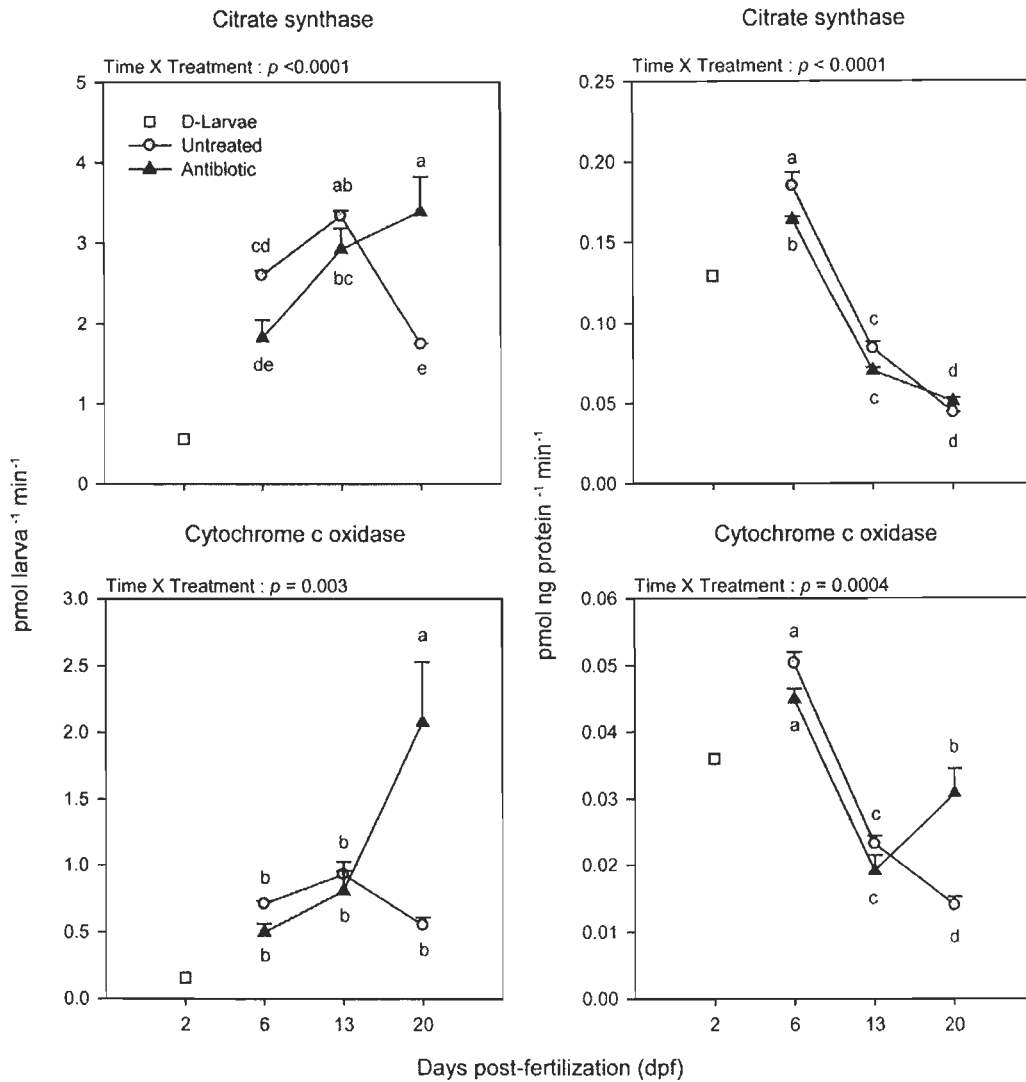


Figure 2.4. Metabolism energy activity of American oyster *Crassostrea virginica* as a function of development time and seawater treatment. Seawater was untreated or treated with an antibiotic. Data are expressed as enzyme activity per larva (left) and specific-protein enzyme activity (right). Data are means \pm SD of three replicate tanks. Different letters indicate significant differences.

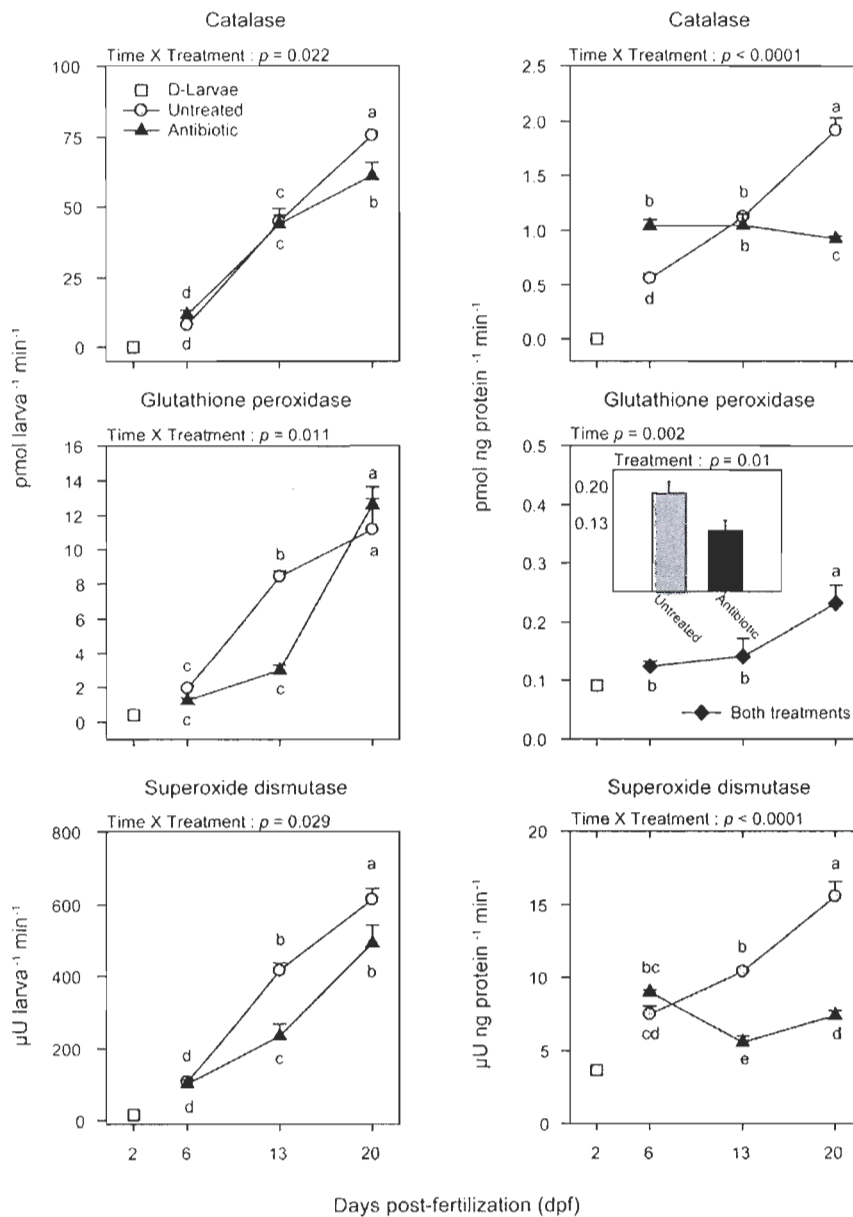


Figure 2.5. Antioxidant enzyme activities of American oyster *Crassostrea virginica* as a function of development time and seawater treatment. Seawater was untreated or treated with an antibiotic. Main effects were plotted when interaction was not significant. Data are expressed as enzyme activity per larva (left) and specific-protein enzyme activity (right). Data are means \pm SD of three replicate tanks. Different letters indicate significant differences.

Table 2.2. Summary of linear regressions between enzymes involved in energy metabolism and antioxidant activities (activity per larva) in American oyster *Crassostrea virginica* (n = 9).

Regression	Treatment	Equation	R ²	P
CS vs. CCO	Antibiotic	CCO=1.60×CS-0.58	0.79	0.001
	Untreated	CCO=0.60×CS+0.12	0.72	0.008
CS vs. CAT	Antibiotic	CAT=280×CS+129	0.65	0.002
	Untreated	n.s.	0.15	0.352
CS vs. GPX	Antibiotic	GPX=0.63×CS-0.16	0.61	0.003
	Untreated	n.s.	0.04	0.644
CS vs. SOD	Antibiotic	SOD=367×CCO+229	0.45	0.014
	Untreated	n.s.	0.17	0.305
CCO vs. CAT	Antibiotic	CAT=274×CCO+148	0.60	0.003
	Untreated	n.s.	0.03	0.668
CCO vs. GPX	Antibiotic	GPX=0.32×CCO+0.19	0.52	0.008
	Untreated	n.s.	0.01	0.860
CCO vs. SOD	Antibiotic	SOD=252×CCO+247	0.74	<0.001
	Untreated	n.s.	0.01	0.778
CAT vs. GPX	Antibiotic	GPX=0.002×CAT-0.29	0.71	<0.001
	Untreated	GPX=0.001×CAT+0.09	0.91	<0.001
CAT vs. SOD	Antibiotic	SOD=1.45×CAT-84	0.91	<0.001
	Untreated	SOD=1.33×CAT-78	0.98	<0.001
GPX vs. SOD	Antibiotic	SOD=609×GPX+233	0.87	<0.001
	Untreated	SOD=1004×GPX+27	0.95	<0.001

Significant probabilities are in bold. CS = citrate synthase, CCO = cytochrome oxidase, CAT = catalase, GPX = glutathione peroxidase, SOD = superoxide dismutase, n.s. = not significant.

Finally, lipid peroxidation, as measured by MDA, varied as a function of time \times treatment (Figure 2.6). The MDA level increased during larval ontogeny irrespective of seawater treatment. Significant differences between treatments were related to the mortality event at 20 dpf, with a peroxidation level \sim 2-fold higher in moribund larvae. This value represents the highest value measured in this study ($[MDA] = 0.114 \pm 10 \text{ pmol larva}^{-1}$). Energy metabolism and antioxidant activities were positively correlated with lipid peroxidation levels, at least in antibiotic treated larvae (Table 2.3). These results illustrate that an increase in energy metabolism in the antibiotic treatment coincided with an increase in oxidative stress and antioxidant defenses.

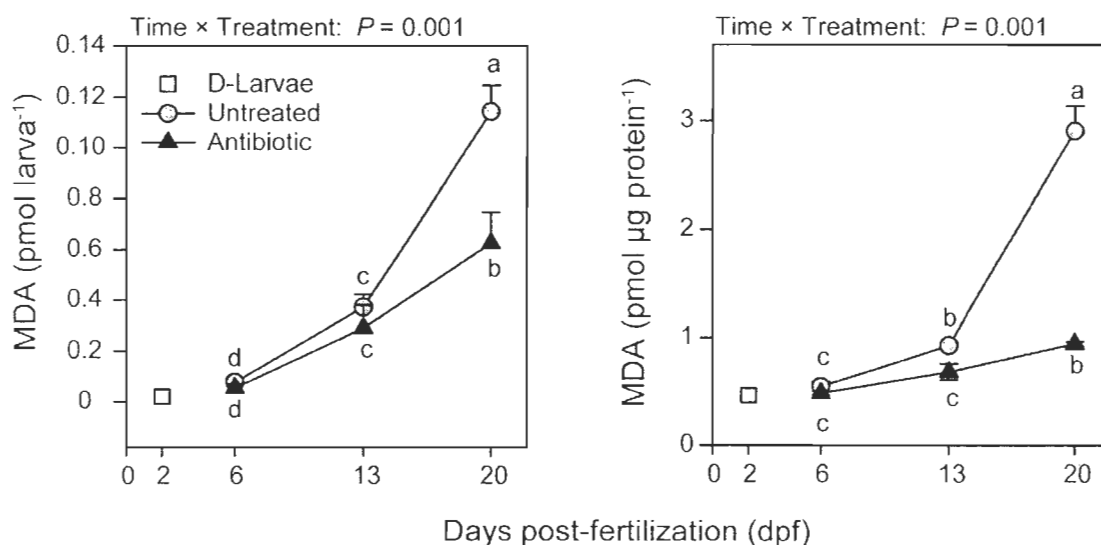


Figure 2.6. Lipid peroxidation levels as measured by malondialdehyde (MDA) in American oyster *Crassostrea virginica* as a function of development time and seawater treatment. Seawater was untreated or treated with an antibiotic. Data are expressed as MDA concentration per larva (left) and per protein content (right). Data are means \pm SD of three replicate tanks. Different letters indicate significant differences.

Table 2.3. Summary of linear regressions between enzyme activities (activity per larva) and malondialdehyde (MDA, content per larva) concentration in American oyster *Crassostrea virginica* (n = 9)

Regression	Treatment	Equation	R ²	P
CS vs. MDA	Antibiotic	MDA=0.03×CS-0.01	0.75	<0.001
	Untreated	n.s.	0.42	0.081
CCO vs. MDA	Antibiotic	MDA =0.02×CCO+0.01	0.82	<0.001
	Untreated	n.s.	0.21	0.259
CAT vs. MDA	Antibiotic	MDA =0.0001×CAT-0.01	0.92	<0.001
	Untreated	MDA =0.0001×CAT-0.02	0.90	<0.001
GPX vs. MDA	Antibiotic	MDA =0.04×GPX+0.01	0.79	<0.001
	Untreated	MDA =0.09×GPX-0.02	0.74	0.006
SOD vs. MDA	Antibiotic	MDA =0.0001×SOD-0.01	0.97	<0.001
	Untreated	MDA =0.0001×SOD-0.02	0.84	0.001

Significant probabilities are in bold. CS = citrate synthase, CCO = cytochrome oxidase, CAT = catalase, GPX = glutathione peroxidase, SOD = superoxide dismutase, n.s. = not significant.

Discussion

Characterization of the massive mortality

Although some abiotic and biotic factors are known to induce high mortality, it is difficult to precisely determine the origin of the mortality outbreak observed at 20 dpf. Antibiotic and untreated larvae showed same growth and survival rates before 20 dpf, suggesting that the larval batches had followed the same evolution before the mortality occurrence. Larvae were reared in controlled system (temperature, pH, lighting, oxygenation) and the analyses of seawater did not revealed the presence of specific pollutant in the tanks that could explained the mortality observed. Interestingly, we observed that the surrounding bacterial community evolved on a different way according to the treatment applied. Similarity index declined progressively between antibiotic and untreated larvae to reach the lowest value at 20 dpf, which coincided with the lowest number of cultivable bacterial and presumptive *vibrio* loads. These results illustrated the progressive action of the antibiotic on the bacterial community. The improvement of larval survival following chloramphenicol treatment has been previously measured in bivalve hatcheries (Nicolas et al. 1996; Gomez-Leon et al. 2005; Torkildsen et al. 2005). It was suggested in these previous researches that protective effect was probably due to capacity of chloramphenicol to decrease the bacterial load in larval tanks, limiting the proliferation of opportunistic pathogens and thus avoiding the occurrence of massive mortality. However, the use of antibiotic favour the selection of resistant bacteria which represent some risks for health and environment. Other methods such as probiotics were proposed as alternative to antibiotic (Kersarcodi-Watson et al. 2008, Prado et al. 2010). The presence of a bacterial pathogen could not be certainly demonstrated, but the higher counts on TCBS plate at 13 and 20 dpf in untreated tanks and the observations of bacillary necrosis symptoms related to *Vibrio* infection in *C. virginica* larvae (Tubiash et al. 1965; Elston and Leibovitz 1980; Estes et al. 2004), suggest the possibility of pathogen infection in the untreated tanks.

Our results suggest that untreated larvae progressively reduced their feeding activity before the massive mortality event while antibiotic treated larvae significantly increased their feeding activity after 15 dpf. The microscopic observations of moribund larvae at 20 dpf showing larvae weakly swimming in circles with their velum partially retracted or reduced suggested that the progressive decrease and cessation of feeding in untreated larvae could be linked to a degeneration of the velum, which is the principal larval feeding organ. The impact of disease on the feeding activity of adult *C. virginica* is well documented (Ward and Langdon 1986; Gale et al. 1991).

The higher concentration of FFA, DG and AMPL in moribund larvae may reflect TAG and PL catabolism. Indeed, FFA, DG and monoacylglycerides (included in the AMPL) usually result from TAG and PL degradation by lipase (Derewenda 1994, Sewell 2005).

The mass mortality was associated with few change on the fatty acid composition of polar lipids. Only the level of naturally biosynthesized 22:2 NMI fatty acid was higher in untreated larvae at 20 dpf, when the mass mortality occurred, compared to untreated oysters at 13 dpf and oysters treated with the antibiotic. An increase in 22:2 NMI may compensate for the decrease in other long-chain PUFA (such as DHA) and the decrease in the peroxidation index of polar lipids attributable to the oxidative stress related to the mass mortality. This hypothesis is supported by the fact that NMI fatty acids are more resistant to oxidation than other PUFA (Klingensmith 1982). It was also suggested that since NMI fatty acids usually occur in the outer membrane of mollusks, their presence may increase the resistance to attack by microbial lipases (Ackman and Hooper 1973).

Mass mortality was also characterized by arrested accumulation of protein and PL in moribund larvae, suggesting a possible catabolism of these constituents. Utilisation of protein as energetic reserves in oyster larvae was well documented (Garcia-Esquivel et al. 2002; Moran and Manahan, 2004). Moreover, the progressive cessation of feeding activity in untreated larvae before mortality appearance could induce a decrease of protein synthesis. Indeed, the impact of starvation on protein content has been demonstrated in

several marine invertebrate species (Moran and Manahan 2003, 2004; Meyer et al. 2007). Regarding the PL, we suggest two possible explanations. First, a portion of the fatty acids from PL could be oxidized (β -oxidation) to respond to the increased energy demand, as observed by Gallagher et al. (1986) in starved *C. virginica* larvae. Second, the lower PL content could be a result of extracellular phospholipase activity by the putative pathogens. Phospholipase activity has been linked to pathogenesis in bacterial species (Testa et al. 1984; Schmiel and Miller 1999; see the review of Istivan and Coloe 2006). The higher FFA content in infected larvae could be linked to this phospholipase activity. However, the validation of this hypothesis would require further specific analyses on membrane integrity and phospholipase activity.

Moribund *C. virginica* larvae showed significant decreases in CS and CCO activities, suggesting a decline in energy production. This metabolic depression could be explained by a lack of energy substrate due to limited feeding, as reported in starved *C. gigas* (Moran and Manahan 2004). The decreases in CS and CCO activities could indicate a decline in respiration rate. Indeed, several studies on marine invertebrates have shown that respiration rate and CS activity were positively correlated (Moran and Manahan 2004; Meyer et al. 2007). In juvenile Manila clams, respiration rate decreased with the development of brown ring disease symptoms (Flye-Sainte-Marie et al. 2007). These authors observed that the oxygen consumption decrease was correlated with decreased feeding (clearance rate) and could be interpreted as a compensatory reduction of metabolic rate, as was observed by Widdows and Hawkins (1989).

Moribund larvae showed an increase in antioxidant enzymes between 13 and 20 dpf that is not attributable to an increase in respiratory activity. This implies another origin of ROS production, for example, a possible increase of ROS associated with the immune response. In bivalves, ROS production during infection have been suggested to be a host defense mechanism to counter attacks of pathogenic bacteria (Canesi et al. 2002; Lambert et al. 2003, Labreuche et al. 2006b). The increase of CAT, GPX and SOD protein-specific activity shows that moribund larvae increased the proportion of antioxidant enzymes in

their tissues, thus pinpointing the importance of antioxidant defenses during the massive mortality event.

The massive mortality event coincided with a higher level of lipid peroxidation, as measured by the peroxidation index of polar lipids and MDA, suggesting higher oxidative stress in moribund larvae. This difference in lipid peroxidation levels was accompanied by a slightly higher antioxidant activity. We hypothesized that until 13 dpf, untreated larvae possessed antioxidant defenses capable of limiting oxidative stress and lipid peroxidation. After this period, the lack of energy production (as suggested by CS and CCO activities) coupled with a potential increase in the generation of ROS for the immune response did not allow the larvae to develop adequate antioxidant defenses to efficiently resist the pathogen challenge. Thus the increase in lipid peroxidation could reflect a saturation in enzymatic antioxidant defenses in moribund larvae.

Development and performance of oyster larvae

In our study, growth rates and TAG levels in *C. virginica* larvae were markedly lower than those reported by others in the same species (Chu and Webb 1984; Gallager et al. 1986). Indeed, growth rates and TAG levels in healthy *C. virginica* are respectively 3–51 $\mu\text{m d}^{-1}$ and 3.6–11.1 ng larva⁻¹ (Chu and Webb 1984) compared to our results of 1.3–8.4 $\mu\text{m day}^{-1}$ and 0.9 ng larva⁻¹ at 20 dpf in this work. Fast growth is achieved by a combination of increased feeding rates, reduced metabolic rates and lower metabolic costs of growth. These physiological traits show intraspecific variation, and some of them are heritable in bivalves (Bayne 2004). Given that the oysters used in this study were fed ad libitum, it is likely that their low performance is related to a batch effect.

Our results show that ontogeny rather than the seawater treatment was the main factor affecting levels of the major long-chain PUFA such as 22:6n-3 (DHA), 20:5n-3 (EPA) and 20:4n-6 (ARA). DHA in *C. virginica* was maintained at higher levels than that in the diet and increased during larval ontogeny until reaching a plateau. In addition, DHA was preferentially accumulated and/or retained at the expense of EPA. These observations agree with the important role that DHA plays during larval development, as has already been

reported in the polar lipids of other bivalve larvae (Delaunay et al. 1993; Farias et al. 2003; Pernet et al. 2005).

In contrast, ARA increased during the embryonic development of *C. virginica* and declined markedly during larval ontogeny to below dietary levels. This result contrasts with those reported in other bivalve species, where an increase in ARA was observed in early development (Pernet et al. 2005; Rico-Villa et al. 2006). A similar decrease in ARA from polar lipids was previously observed in *Pecten maximus* larvae fed low-ARA phytoplankton species (Delaunay et al. 1993). However, the dietary level of ARA was ca. 3.3% in our study and cannot be considered as deficient. Therefore, utilization of ARA from polar lipids during the larval ontogeny of American oysters needs further investigation.

The CS and CCO activities increased in the antibiotic treatment between 13 and 20 dpf, corresponding to a period of increasing feeding activity and energetic reserves accumulation (protein and TAG). This observation suggests an increase of energy metabolism with ontogeny when food is available, as has been demonstrated in several marine invertebrate species (Moran and Manahan 2003, 2004; Meyer et al. 2007). Protein-specific activities of CS and CCO increased during larval ontogeny and reflect overall increase in total protein content, as previously reported in *C. gigas* by Moran and Manahan (2004). Parallel to this, we measured an increase in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation during larval development in American oysters. As observed for energetic metabolism enzymes, protein-specific activities of antioxidant enzymes increased during larval ontogeny and reflect overall increase in total protein content, except for GPX. The correlation between energetic metabolism and antioxidant enzymes as well as that between energetic metabolism and lipid peroxidation in the antibiotic treatment seem to indicate that antioxidant defenses adapt to the increased ROS generation during energy production (Nohl et al. 2003, 2005). Such correlations have been demonstrated in other organisms, such as polychetes (Marie et al. 2006), fish (Morales et al. 2004) and mammals (Leeuwenburgh et al. 1997). However, the role of ROS and antioxidants during embryonic and larval development of aquatic animals in general and invertebrates in particular has

been little studied (Dandapat et al. 2003; Regoli et al. 2005; Kalaimani et al. 2007). During egg and embryonic development, a gradual increase in oxygen uptake was seen in the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* that appeared to be counteracted by an increase in CAT, GPX and SOD activities (Dandapat et al. 2003), illustrating the importance of antioxidant defenses in marine invertebrate larval development.

Conclusion

In summary, this study improves our understanding of the mass mortality phenomena that affect bivalve hatcheries. We showed that mortality in oyster larvae coincided with strong changes in the surrounding bacterial community that could affect larval development at different levels. Mortality emergence causes a progressive decrease in the feeding activity of untreated larvae, affecting their ability to recover their energy reserves and resulting in a decrease of energy production, as suggested by lower CCO and CS activities. This low energy availability could reduce the efficiency of the antioxidant defenses, leading to an increase in lipid peroxidation and finally to the mass mortality event. This study also allowed us to characterize ontogenic changes in lipid classes and fatty acid composition as well as in metabolic and antioxidant enzymes.

Acknowledgments

The authors are grateful to the IRZC staff for oyster production. Thanks are addressed to Laure Devine for linguistic revision. This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Réseau Aquacole du Québec to F.P. and R.T.

Literature cited

Ackman R.G., Hooper S.N., 1973, Non-methylene-interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates, a comparison of two molluscs (*Littorina littorea* and

Lunatia triseriata) with the sand shrimp (*Crangon septemspinosus*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 46, 153-165.

Bayne B.L., 2004, Phenotypic flexibility and physiological tradeoffs in the feeding and growth of marine bivalve molluscs. *Integr. Comp. Biol.* 44, 425-432.

Bell J.G., Sargent J.R., 2003, Arachidonic acid in aquaculture feeds, current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491-499.

Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C., 2002, Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Techniq.* 57, 469-476.

Childress J.J., Somero G.N., 1979, Depth-related enzyme activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar. Biol.* 52, 272-283.

Chu F.-L., Webb K.L. 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids* 19, 815-820.

Dandapat J., Chainy G.B.N., Rao K.J., 2003, Lipid peroxidation and antioxidant defense status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 135, 221-233.

Delaunay F., Marty Y., Moal J., Samain J.-F., 1992, Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 209-219.

Delaunay F., Marty Y., Moal J., Samain J.-F., 1993, The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173, 163-179.

Derewenda Z.S., 1994, Structure and function of lipases. *Adv. Protein Chem.* 45, 1-52.

- Elston R., Leibovitz L., 1980, Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 964-978.
- Estes R.M., Friedman C.S., Elston R.A., Herwig R.P., 2004, Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. Dis. Aquat. Org. 58 , 223–230.
- Farias A., Bell, J.G., Uriarte I., Sargent J.R., 2003, Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae, effects of diet and temperature. Aquaculture 228 , 289-305.
- Flohé L., Ötting F., 1985, Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol. 150 , 93-104.
- Flye-Sainte-Marie J., Pouvreau S., Paillard C., Jean F., 2007, Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 349, 378-389.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H., 1957, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- Gale L.D., Manzi J.J., Crosby M.P., 1991, Energetic costs to the eastern oyster *Crassostrea-virginica* due to recent parasitism by the ectoparasitic gastropod *Boonea impressa*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 79, 89-98.
- Gallager S.M., Mann R., Sasaki G.C., 1986, Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. Aquaculture 56, 81-103.
- Garcia-Esquivel Z., Bricelj V.M., Felbeck H., 2002, Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. Comp. Biochem. Physiol. 133 , 63-77.
- Gomez-Leon J., Villamil L., Lemos M.L., Novoa B., Figueras A., 2005, Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes*

- decussatus*) larvae associated with mass mortalities. Appl. Environ. Microbiol. 71 , 98-104.
- Griffiths S., Melville K., Cook M., Vincent S., St Pierre M., Lanteigne C., 2001, Profiling of bacterial species associated with haddock larviculture by PCR amplification of 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis. J. Aquat. Anim. Health. 13, 355-363.
- Guillard R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In, Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals. New York, Plenum Press, pp. 29-60.
- Holland D.L., Spencer B.E., 1973, Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 53, 287-298.
- Istivan T.S., Coloe P.J., 2006, Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. Microbiology. 152, 1263-1274.
- Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M. J., Gibson L., 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture 274, 1-14.
- Klingensmith J.S., 1982, Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). Lipids 17, 976-981.
- Labreuche Y., Soudant P., Goncalves M., Lambert C., Nicolas J.L., 2006a, 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, 367-379.

- Labreuche Y., Lambert C., Soudant P., Boulo V., Huvet A., Nicolas J.L., 2006b, Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* 8, 2715–2724.
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C., 2003, Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immun.* 15, 225-240.
- Lambert C., Soudant P., Degremont L., Delaporte M., Moal J., Boudry P., Jean F., Huvet A., Samain J.F., 2007, Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* 270, 276-288.
- Langdon C.J., Waldock M.J., 1981, The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 61, 431-448.
- Lepage G., Roy C.C., 1984, Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 25, 1391-1396.
- Leeuwenburgh C., Hollander J., Leichtweis S., GriYths N., Gore M, Ji L.L., 1997, Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am. J. Physiol.* 272, R363–R369.
- Marie B., Genard B., Rees J. F., Zal F., 2006. Effect of ambient oxygen concentration on activities of enzymatic antioxidant defences and aerobic metabolism in the hydrothermal vent worm, *Paralvinella grasslei*. *Mar. Biol.* 150, 273-284.
- McCord J.M., Fridovich I., 1969, Superoxide Dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

- Meyer E., Green A.J., Moore M., Manahan D.T., 2007, Food availability and physiological state of sea urchin larvae (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Mar. Biol.* 152, 179-191.
- Morales A.E., Perez-Jimenez A., Hidalgo M.C., Abellan E, Cardenete G., 2004, Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 139:153–161.
- Moran A.L., Manahan D.T., 2003, Energy metabolism during larval development of green and white abalone, *Haliotis fulgens* and *H. sorenseni*. *Biol. Bull.* 204, 270-277.
- Moran A.L., Manahan D.T., 2004, Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 306, 17-36.
- Nicolas J.L., Corre S., Gauthier G., Robert R., Ansquer D., 1996, Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27, 67-76.
- Nohl H., Gille L., Staniek K., 2005, Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 69, 719-723.
- Nohl H., Kozlov A.V., Gille L., Staniek K., 2003, Cell respiration and formation of reactive oxygen species, facts and artefacts. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1308-1311.
- Paglia D.E., Valentine W.N., 1967, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathion peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158-168.
- Paillard C., Le Roux F., Borrego J.J., 2004, Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17, 477-498.
- Parrish C.C., 1999, Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In, Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*, New York, Springer-Verlag, pp. 5-20

- Pernet F., Bricelj V.M., Cartier S., 2006a, Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 329, 265-280.
- Pernet F., Bricelj V.M., Parrish C.C., 2005, Effect of varying dietary levels of omega 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 327, 115-133.
- Pernet F., Pelletier C.J., Milley J., 2006b, Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves. J. Chromatogr. A 1137, 127-137.
- Plante S., Pernet F., Hache R., Ritchie R., Ji, B., McIntosh, D., 2007, Ontogenetic variations in lipid class and fatty acid composition of haddock larvae *Melanogrammus aeglefinus* in relation to changes in diet and microbial environment. Aquaculture 263, 107-121.
- Prado S., Romalde J. L., Barja J. L., 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. Vet. Microbiol. 145, 187-197.
- Regoli F., Nigro M., Benedetti M., Fattorini D., Gorbi S., 2005, Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*, Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. Aquat. Toxicol. 75 , 43-52.
- Rico-Villa B., Le Coz J.R., Mingant C., Robert R., 2006, Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberb). Aquaculture 256 , 377-388.
- Samain J.F., Degremont L., Soletchnik P., Haure J., Bedier E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Boulo V., Soudant P., Nicolas J.L., Le Roux F., Renault T., Gagnaire B., Geret F., Boutet I., Burgeot T., Boudry P., 2007, Genetically based resistance to summer

mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227-243.

Schmiel D.H., Miller V.L., 1999, Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microb. Infect.* 1, 1103-1112.

Sewell M.A., 2005, Utilization of lipids during early development of the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 304, 133-142.

Smith W.L., Murphy R.C., 2003, The eicosanoids, cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In, Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, vol. 36. Amsterdam, Elsevier Science, pp. 341-371

Testa J., Daniel L.W., Kreger A.S., 1984, Extracellular Phospholipase A2 and Lysophospholipase Produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 45, 458-463.

Torkildsen L., Lambert C., Nylund A., Magnesen T., Bergh, O., 2005, Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*, impact on larval survival. *Aquacul. Inter.* 13, 575-592.

Tubiash H.S., Chanley P.E., Leifson E., 1965, Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.* 90, 1036-1044.

Ward J.E., Langdon C.J., 1986, Effects of the ectoparasite *Boonea (Odostomia) Impressa* (Say) *Gastropoda pyramidellidae*, on the growth rate, filtration rate and valve movements of the host *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 99, 163-180.

Widdows J., Hawkins A.J.S., 1989, Partitioning of rate of heat dissipation by *Mytilus edulis* into maintenance, feeding, and growth components. *Physiol. Zool.* 62, 764-784.

Yonetani T., 1967, Cytochrome oxidase, beef heart. *Methods Enzymol.* 10, 332-335.

Chapitre 2

Étude des niveaux d'expression de gènes candidats pour caractériser le métabolisme, l'immunité et le stress cellulaire pendant l'émergence d'une mortalité de masse chez des larves d'huître américaine *crassostrea virginica*

Ce deuxième article, intitulé « Expression of candidate genes related to metabolism, immunity and cellular stress during massive mortality in the american oyster *crassostrea virginica* larvae in relation to biochemical and physiological parameters. », a été corédigé par moi-même, mon directeur Réjean Tremblay, mon codirecteur Fabrice Pernet et les chercheurs Elise David, Pierre Boudry et Dario Moraga. Il a été soumis dans *Gene* et est présentement en cours d'évaluation. Ma contribution à ce travail a été l'essentiel des échantillonnages, des analyses et des statistiques ainsi que l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article. Réjean Tremblay et Fabrice Pernet ont fourni l'idée originale et conçu le plan de l'étude, et ont aussi aidé à la coordination de la recherche et à l'écriture du manuscrit. Elise David et Dario Moraga ont aidé pour la mise au point des protocoles en génomique et pour la révision de l'article. Pierre Boudry a aidé à l'élaboration du projet et à la révision du papier. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final. Des versions abrégées de cet article ont été présentées à la conférence de l'Aquaculture Association of Canada à Halifax (Canada) en 2006 et au 3^{ème} colloque international de Physiomar en 2008 à Brest (France). Une affiche reprenant l'essentiel des résultats a été présentée à la réunion annuelle du Réseau aquaculture Québec (RAQ) en 2008 à Québec (Canada).

RÉSUMÉ

Les niveaux d'expression de gènes candidats associés au métabolisme, à l'immunité, au stress cellulaire ont été examinés en relation avec l'émergence d'une mortalité de masse chez des larves d'huîtres américaines, *Crassostrea virginica*. Afin d'avoir une vision du moléculaire au physiologique des changements associés à cette mortalité, les résultats d'expression ont été comparés avec les données biochimiques et physiologiques précédemment décrites dans un article conjoint. Parmi les 18 gènes étudiés, comparativement au control antibiotique, 10 affichent une expression génique relative plus faible quand la mortalité de masse apparaît. Six d'entre eux sont associés au métabolisme, corroborant la dépression métabolique suggérée par les analyses biochimiques et physiologiques. Des similitudes ont été également faites entre les niveaux d'expression de deux gènes associés au métabolisme des lipides et la composition lipidiques des larves. De même, plusieurs relations ont pu être mises en avant entre la régulation des enzymes antioxydantes, la peroxydation des lipides et le niveau de transcript de gènes impliqués dans le stress oxydatif, la cytoprotection et la réponse immunitaire. Enfin, nous avons observés simultanément à l'émergence de la mortalité, une surexpression de deux gènes associés dans l'apoptose et la régulation cellulaire suggérant que ces processus sont impliqués dans l'apparition de la mortalité.

EXPRESSION OF CANDIDATE GENES RELATED TO METABOLISM, IMMUNITY AND CELLULAR STRESS DURING PREMETAMORPHIC MASSIVE MORTALITY IN THE AMERICAN OYSTER *CRASSOSTREA VIRGINICA* IN RELATION TO BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS

GENARD Bertrand¹, MORAGA Dario², PERNET Fabrice³, DAVID Élise^{2,4}, BOUDRY Pierre⁵ and TREMBLAY Réjean^{1*}

1 Institut des sciences de la mer, Université du Québec à Rimouski, 310, allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada

2 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France

3 Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, Laboratoire Environnement Ressources en Languedoc-Roussillon, Bd Jean Monnet, Sète, France

4 Laboratoire d'Eco-Toxicologie, UPRES-EA2069 Unité de Recherche « Vigne et Vins de Champagne : Stress et Environnement » (URVVC), Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 02, France

5 Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, UMR M100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Technopole de Brest-Iroise BP 70 29280, Plouzané, France

Keywords : *Crassostrea virginica*, massive mortality, relative gene expression, metabolism, immunity, cellular stress.

Abstract

Quantification of mRNA of genes related to metabolism, immunity and cellular stress was examined in relation to a massive mortality event during the culture of American oyster larvae, *Crassostrea virginica* which was probably, in regard to previous microbiological analysis, induced by *vibrio* infection. To document molecular changes associated with the mortality event, mRNA levels were compared to biochemical and physiological data, previously described in a companion paper. Among the 18 genes studied, comparatively to the antibiotic control, 10 showed a lower relative gene expression when the massive mortality occurred. Six of them are presumed to be related to metabolism, corroborating the metabolic depression associated with the mortality event suggested by biochemical and physiological analyses. Interestingly, similarities were observed between the expression of two genes presumed to be involved in lipid metabolism and observed lipid content. Relationships between the regulation of antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and the mRNA abundance of genes linked to oxidative stress, cytoprotection, and immune response are also discussed. Finally, we observed an increase in the transcript abundance of two genes involved in apoptosis and cell regulation simultaneously with mortality, suggesting that these processes might be linked.

Introduction

Massive mortality of bivalve larvae has often been associated with a low quality of water or of micro algae provided as food for aquaculture production, promoting the proliferation of opportunistic pathogenic microorganisms (Olafsen 2001; Paillard *et al.* 2004). Many studies have been dedicated to the identification and characterization of pathogenic microorganisms to such mortalities but, to our knowledge, few physiological or molecular studies have yet been carried out to study larvae during such mortality events. This is indeed related to the technical difficulties to study such rapid phenomenon on very small organisms. In addition to biochemical and physiological approach (Tukinov *et al.* 2010), recently developed genomic tools can now be used to better document larval responses. In the last decade, cDNA collections and Expressed Sequence Tags (EST) have been developed for several bivalve species, and they account for the large number of RNA sequences available in public databases (Jenny *et al.* 2007; Quilang *et al.* 2007; Tanguy *et al.* 2008; Fleury *et al.* 2009; Zapata *et al.* 2009; Collin *et al.* 2010; Sussarellu *et al.* 2010). Such an increasing number of EST databases provides the opportunity to further characterize bivalve mortality events. For example, Huvet *et al.* (2004) and Fleury *et al.* (2010) successively used suppression subtractive hybridization and microarrays to identify genes differentially expressed between lines of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, selected to be resistant or susceptible to summer mortality. Genes involved in immunity and disease resistance, including some coding for anti-microbial peptides and proteins, related to pathogen defence following pathogenic bacteria challenges (Mitta *et al.* 2000; Seo *et al.* 2005; Gonzalez *et al.* 2007; Travers *et al.* 2010). In the American oyster, EST collections are being used to identify genes with putative functions in the cellular and biochemical processes implicated in the resistance to *Perkinsus marinus* (Tanguy *et al.* 2004; Wang *et al.* 2010). Disease resistance or sensitivity is often modulated by physiological status and environmental stress (Cheney *et al.* 2000; Mydlarz *et al.* 2006; Samain *et al.* 2007). Similarly, other subtractive cDNA libraries have been developed and characterized, aiming at identifying genes related to the stress response to pollutants

(Boutet *et al.* 2004; Tanguy *et al.* 2005a; Collin *et al.* 2010 or abiotic factors (David *et al.* 2005; Meistertzheim *et al.* 2007 ;).

To date, the majority of genomic approaches have been carried out on adult bivalves and little is known about gene regulation at larval stage. Tanguy *et al.* (2005b) studied gene regulation of glutamine synthetase during *C. gigas* ontogeny, and similar studies were performed by Jenny *et al.* (2006) on metallothionein in *C. virginica*. Jenny *et al.* (2002) produced two EST collections from embryos and haemocytes of the American oyster to identify genes that are potentially related to immune and stress response. More recently, Tirape *et al.* (2007) studied the expression of immune-related genes during ontogeny and bacterial challenge in *C. gigas*.

In this context, we selected 18 candidate genes, presumed to be involved in metabolism (energy production, protein synthesis, and lipid remodelling), immunity (pathogen recognition, proteinase, apoptosis, and inflammatory response) and cellular stress (antioxidant defences, xenobiotic detoxification and cytoprotection). Relative expression of these 18 genes was studied by quantification of mRNA using real time PCR, during a mortality event in larvae of the American oyster *C. virginica* and compared with an antibiotic-treated control that showed no significant mortality. Results are discussed in the light of biochemical and physiological data reported in a companion paper (Genard *et al.* 2011).

Materials and methods

Experimental design and physiological characterization of the mortality event

Details about the rearing procedure and experimental design are presented in Genard *et al.* (2011). Briefly, this work was done at the hatchery of the Coastal Zone Research Institute (CRZI, Shippagan, New Brunswick, Canada) during winter 2006. After fertilization, larvae were reared at 10 individuals mL⁻¹ in a 415 L Xactic@ tank in a double cartridge-filtered seawater (1 µm and 0.5 µm). Larvae were fed with a mixture of three

microalga species *Isochrysis* sp. (T-ISO), *Pavlova lutheri* (MONO), and *Chaetoceros muelleri* (CHGRA). Two days after fertilization, D-larvae were collected on a 44 μm square mesh filter, enumerated, and split equally into two experimental treatments. Larvae were cultivated in triplicate with or without antibiotic (chloramphenicol at 4 mg L⁻¹; Fluka, Mississauga, ON). Larval samples (100 000 larvae per sample) were collected at 6, 13, and 20 dpf (days post fertilization).

Mortality event occurred 20 days after fertilization in untreated tanks (see Genard *et al.* 2011 for further details). Mortality was associated with (1) strong changes in the bacterial community structure, (2) a progressive decrease in feeding activity, (3) higher levels of some lipid classes (free fatty acids, diglycerides, and acetone mobile phospholipids), (4) lower levels of phospholipids and protein, (5) higher contents of non-methylene interrupted dienoic fatty acids (22:2 NMI), (6) a decrease in energy metabolism activity (citrate synthase and cytochrome oxidase activities), (7) a higher oxidative stress (lipid peroxidation level), and (8) an activation of antioxidant defences before mortality (glutathione peroxidase and superoxide dismutase).

RNA extraction

Total RNA was extracted for each replicate (between 2 and 3 depending on larval availability) using TRIzolTM Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. RNA was resuspended in RNase-free water and concentrations were determined by OD260 measurements.

Real-time PCR

Ten micrograms of total RNA extracted from each developmental stage were reverse transcribed using the oligo(dT) anchor primer and Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega). Real-time PCR was performed with 5 μL cDNA (1/20 dilution) in a total volume of 25 μL , using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The concentrations of the reaction components were 1 x Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (ABgene, Epsom, UK) and 70 nM of each primer.

Reactions began with the activation of Thermo-Start DNA polymerase at 95°C for 15 min followed by amplification of the target cDNA (50 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing and extension at 60°C for 1 min), and melting curve analysis was performed with continuous fluorescence acquisition (95°C to 70°C at a temperature transition rate of 0.5°C every 10 s) to determine the amplification specificity. Each run included a negative control (non reverse-transcribed total RNA) and blank controls (water) for each primer pair.

The relative level of target gene expression was based on a comparative method (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). The threshold value (Ct) was determined for each target as the number of cycles at which the fluorescence curve entered exponential phase. The relative quantification value of a sample is expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (target sample) - ΔCt (reference sample) and $\Delta Ct = Ct$ (target gene) - Ct (housekeeping gene). Three genes coding for a ribosomal protein subunit were selected as putative housekeeping genes. All of these reference genes were amplified at all stages and in the two treatments. Ribosomal 18s was found to have the lowest variation during the experiment and was then chosen as the housekeeping gene for the rest of the analyses (Figure 3.1). Larvae treated with antibiotics from each sampling day as well as 6-day-old larvae from each treatment were used as reference samples to determine treatment differences and ontogenic changes, respectively.

Studied genes

Oligonucleotide primer sequences used to amplify specific gene products are shown in Table 3.1. Selected genes could be classified into four groups: metabolism, immunity, cell regulation, and cellular stress. To monitor the putative metabolic changes induced by mortality emergence, we characterized expression of four genes involved in ATP synthesis (malate dehydrogenase (*MDH*), NADH dehydrogenase subunit 1 (*NDH-1*), cytochrome C1 (*CC-1*) and ATP synthase f0 subunit6 (*AS-6*)), two genes of lipids metabolism (endothelial lipase (*EDL*) and delta9 desaturase (*D9-des*) and two of protein synthesis (glutamine synthetase (*GS*) and translation initiator factor eIF-2B delta subunit (*eIF-2b*)).

To investigate immune response and cell regulation, six genes (cathepsin B (*CTB*), annexin (*ANX*), natural killer receptor (*NK-rec*), killer cell lectin-like receptor (*KC-rec*), MYC-homolog (*MYC-h*) and RAS suppressor (*SUP*)) was selected from previous EST collections. Finally, cellular stress was investigated through expression of genes involved in antioxidant defense (peroxideroxin 6 (*PRDX6*)), cytoprotection (heat shock protein 70 (*HSP70*) and permine (*PRN*)) and xenobiotic detoxification (cytochrome P 450 (*CP450*)).

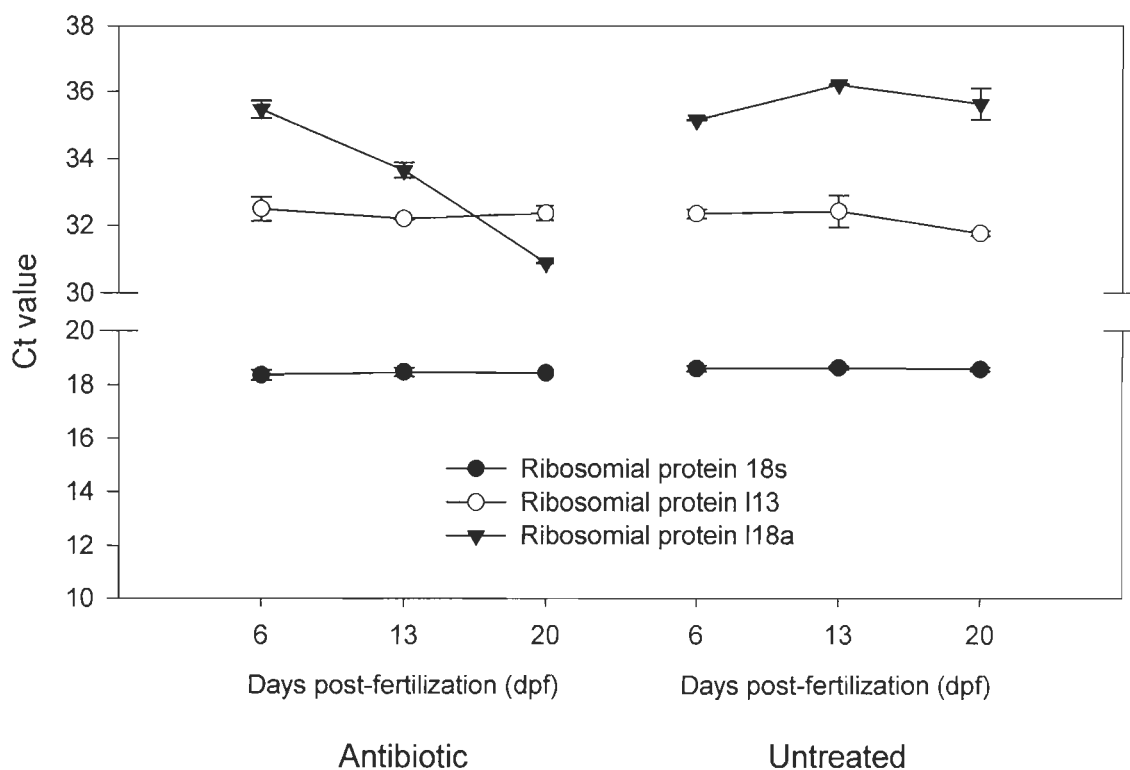


Figure 3.1. Ct values of selected housekeeping genes in *Crassostrea virginica* larvae as a function of development time and seawater treatment. Seawater was treated or not treated with an antibiotic. Data are means \pm SD.

Table 3.1. Details of genes and primers used in the quantitative real-time PCR relative expression analysis.

Genes	Label	GEN BANK ref.	Function	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Ribosomal protein 18s	R18s	CX069129	Putative housekeeping gene	GTCTGGTTAATCCGATAACGAAACGGAACCTCTA	TGCTCAATCTCGTGTGGCTAAACGCAACTTG
Malate dehydrogenase precursor	MDH	BG624325	Energy metabolism (acid citric cycle)	ACTGAAGTTGTGGAGGCTAAGGCT	ATTCCTAGATTTTCTCCACACC
NADH dehydrogenase subunit 1	NDH-1	CD648997	Energy metabolism (electron chain transport complex I)	TCGGCGCTGCTTCCACGGTT	TTACCGCACCAAGAGCTACGCAGC
Cytochrome C1	CC-1	CD526711	Energy metabolism (electron chain transport complex III)	CTTGCTTTTTTTCAGACACATAGA	GCATTATCCAGACAGGTAGTCCATTATGAG
ATP synthase f0 subunit 6	AS-6	EE677700	Energy metabolism (electron chain transport complex V)	ATGCCAAGCATGTTCTACAGAGT	GCAAAGGATCGCTCCTACCAAAGC
Delta9 desaturase	D9-des	CX069227	Lipid metabolism (fatty acid desaturation)	TACTGTCTTCTGCTAAACGCCAC	GTCGTGATATTGAGTGCCAGCC
Endothelial lipase precursor	EDL	CD647348	Lipid metabolism (phospholipase)	GCCCCACCATGGGATACGCCGG	TGGCACCCCGGTTGCTCGTCCC
Glutamine synthetase	GS	CG1753	Protein metabolism (amino acid synthesis)	ACGGAGTTGACGGGACTT	GCTGGCACACGATTGG
Translation initiation factor eIF-2B delta subunit	eIF-2B	EE677861	Protein synthesis regulation (DNA translation)	GGCTGGTATCCCTTGCTCCTA	CACTTTAGTAGCCTTTCGATTGC
Cathepsin B	CTB	BG624471	Proteolysis, pathogen recognition	CCTACTCCATCAAGTCATGTGACCA	ATACCCAGTGAAGCGCCCTCT
NKR-P1B (Natural Killer receptor)	NK-rec	BG624594	Non-self recognition (lectin receptor family)	GCCTGATTAAGTGCCCATGATGGTTC	GAGTGCCCAAGTCATGGGCCACACCCA
Killer Cell lectin-like receptor	KC-rec	BG624932	Non-self recognition (lectin receptor family)	GGTCTTTGCCAGTTTCGGGTTATAAC	TGGTCTCGGGAGACACCAATATGGCCT
Annexin	ANX	CD648336	Apoptosis, inflammation response	GATAAGAATCATGCTACTCGGGCCGA	AATTTTCACTTAAACACTCCCACATAC
Peroxiredoxin 6	PRDX6	CX069146	Oxidative stress (antioxidant enzyme)	GATGACGTCCCCAGTCATGAGGGTGGTC	TGGGGATGGAGGGTAAGACCATACACTT
Cytochrome P 450	CP450	CD526847	Xenobiotic detoxification	GTGCATCAAAGAATTTGGATAC	TGCAATAATTTTGAAGCCCCGG
Heat shock protein 70	HSP70	CX069205	Chaperone protein (cytoprotection)	ATGAGTAAACCAACAGGCCATCGG	AAGATAGTGTTCGTAGGGTTCATGGC
Perrin precursor	PRN	CD526735	Iron chelator (cytoprotection)	CTCCTGATCATGCTGAACCT	GATCATGTTTGTTCGGTTCATC
RAS suppressor	SUP		Cell division inhibitor, apoptosis	ACTGAAGTTGTGGAGGCTAAGGCT	ATTCCTAGATTTTCTCCACACC
MYC-homologe	MYC-h	CX069136	Cell division, proto-oncogene	TTCTATAACGGAACTTATACCAACAAGG	CAACATTTACTGGGGCAGGTGGGTTCCAG

Statistical analysis

Analyses were carried out using Software SAS® system (8.2). The significance value for all analyses was set at $p < 0.05$. PROC GLM (one-way ANOVA) was used to compare relative gene expression between treatments at each sampling days and to show ontogenetic effects on each treatment. Where differences were detected, LSMEANS (t-test) multiple comparisons tests were used to determine which means were significantly different. Residuals were graphically assessed for normality using the PROC PLOT function coupled with univariate procedure (PROC UNIVARIATE). Homogeneity was tested using the O'brien test. When normality precept was not realized, LOG transformation was used. Linear regressions were carried out using Sigma plot 8.0 (SYSTAT Software Inc, USA). Data were presented with mean \pm standard deviation.

Results

Relative gene expression between treatments

RT-PCR was performed with RNA isolated from larvae of 6 to 20 dpf; transcripts were detected in all larval stages. Transcript levels were compared between treatments at each sampling day (using the antibiotic treatment as a reference sample), led us to classify the 18 genes into six groups of response (Figure 3.2). In the first group, which included *MDH*, *CP450*, *D9-des*, and *NK-rec*, no significant differences were found between treatments. *NDH-1*, *CCI*, *AS-6*, and *EDL* constituted the second group and were characterized by a significantly lower gene expression in untreated larvae at 20 dpf, when massive mortality occurred. The third group included the two genes involved in protein synthesis (*GS* and *eIF-2B*); it showed over-expression at 6 and 13 dpf and under-expression when mortality occurred in the untreated larvae. The fourth group, *PRN*, *HSP70*, and *MYC-h*, had significantly higher expression levels at 13 dpf and significantly lower levels at 20 dpf in untreated larvae. *PRDX6* and *KC-rec* showed a similar pattern except at 20 dpf, when no significant difference was found. *ANX* and *SUP* composed the last group, in which we measured significantly higher expression levels between 13 and 20 dpf in

untreated larvae. Finally, the unclassified *CTB* was characterized by a higher transcript level at 6 dpf, a similar level at 13 dpf, and a lower level at 20 dpf in untreated larvae.

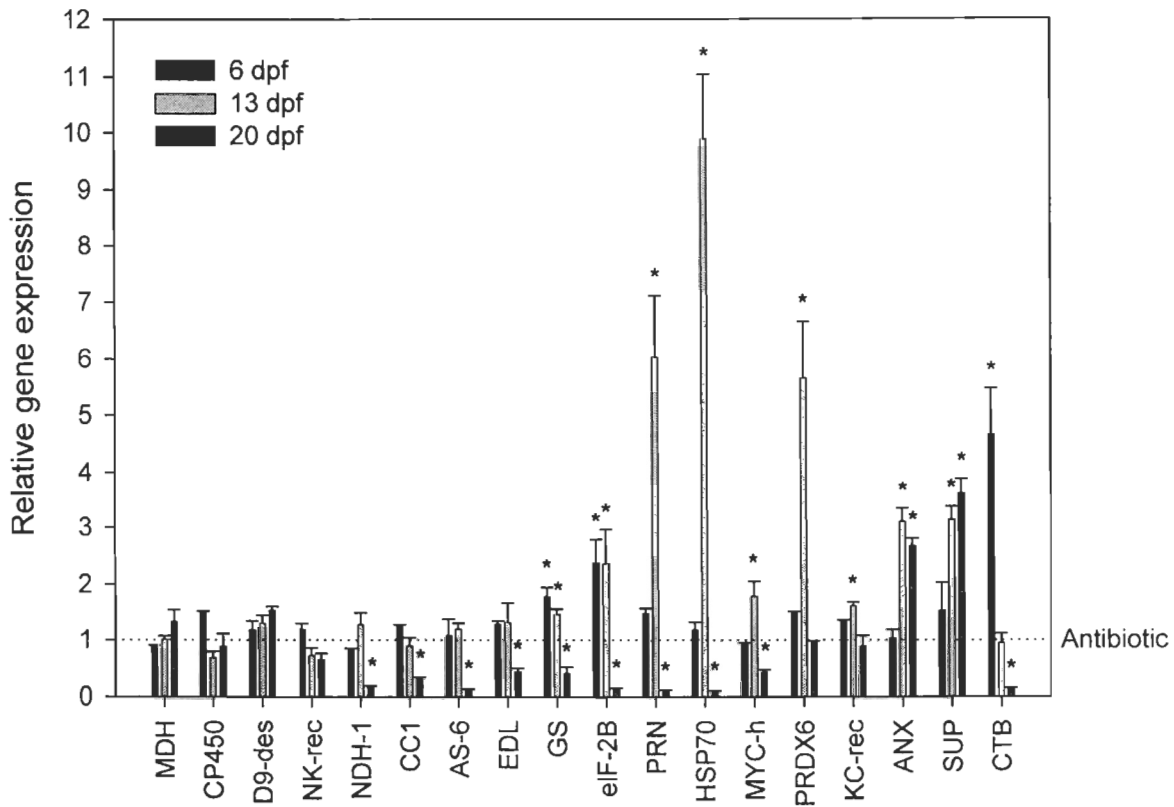


Figure 3.2. Relative expression of selected genes in *Crassostrea virginica* larvae untreated with antibiotic. A massive mortality was observed at 20 dpf. Relative gene expression data were estimated by comparison with the corresponding level from larvae that had the antibiotic treatment. Data are means \pm SD, * Significant difference ($p < 0.05$), --- reference level (antibiotic); see Table 3.1 for gene abbreviations.

Temporal changes of transcript abundance

The temporal changes of gene expression in both treatments was estimated by comparing transcript levels in 6-day-old larvae (reference sample) with levels measured on subsequent sampling days. In antibiotic treated larvae (Figure 3.3), the evolution of transcript abundance for genes linked to energy production (*NDH-1*, *CC-1*, and *AS-6*) showed that relative gene expression was stable until 20 dpf, when a significant increase was observed. The regulation of *GS* and *eIF-2B* were characterized by an increased expression at 13 dpf followed by a decrease at 20 dpf. The expression level of *EDL* increased progressively until 20 dpf. *D9-des* transcript levels showed a significant peak at 13 dpf (~ 2.5 times higher than at 6 dpf). *PRDX6* gene expression increased significantly between 13 and 20 dpf. Transcripts of *MYC-h*, *NK-rec*, *KC-rec*, and *CTB* showed peaks of expression at 13 dpf. *MDH*, *PRN*, *HSP70*, *CP450*, *ANX*, and *SUP* did not vary significantly during larval development.

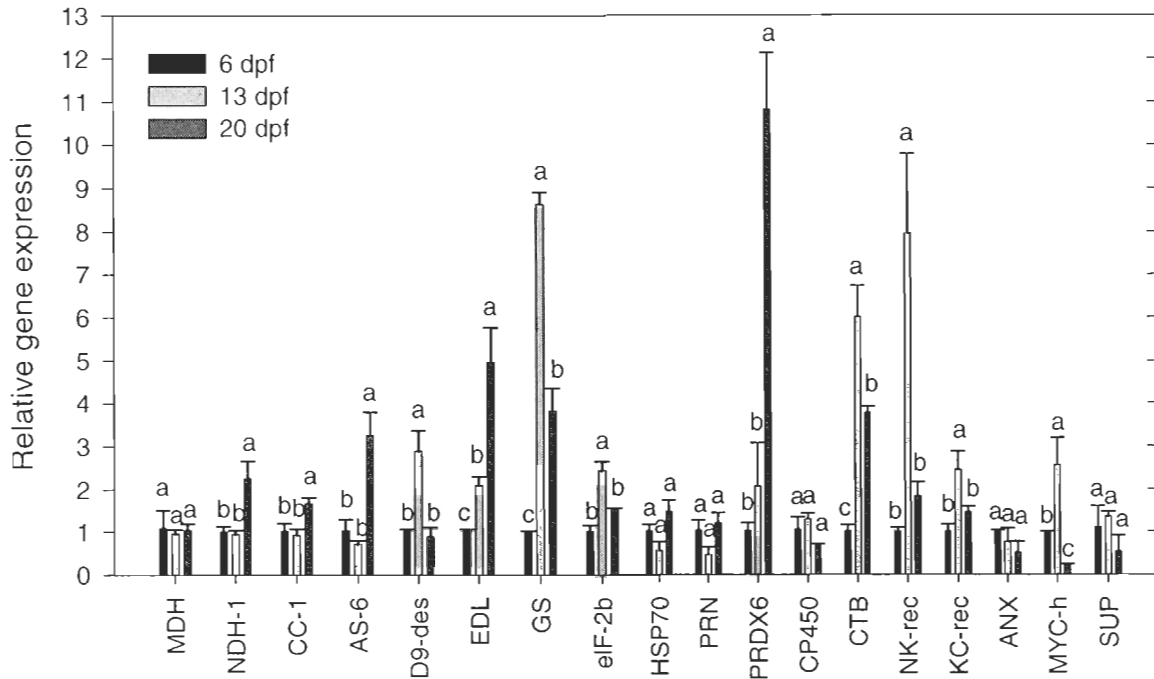


Figure 3.3. Evolution of transcript abundance in *Crassostrea virginica* larvae as a function of development time in seawater treated with an antibiotic. Relative gene expression data were estimated by comparison with the level measured in 6-day-old larvae. Data are means \pm SD; see Table 3.1 for gene abbreviations. Different letters indicate significant differences.

In untreated larvae (Figure 3.4), the evolution of transcript abundance allowed us to classify genes into five groups. The first included *NDH-1*, *CC-1*, *AS-6*, and *CTB*; the relative expression here decreased significantly at 20 dpf, when mortality occurred. The second regrouped *D9-des*, *GS*, *NK-rec*, *KC-rec*, *ANX*, and *SUP*, and was characterized by a peak expression at 13 dpf. A similar pattern was noted for the third group (*EDL* and *PRDX6*) except that no significant difference was observed between 13 and 20 dpf. *EIF-2B*, *HSP70*, *PRN*, and *MYC-h* composed the fourth group, which was characterized by an increased gene expression at 13 dpf and by a strong decrease at 20 dpf. Finally, no significant differences were found in larval development for the last group, which included *MDH* and *CP450*.

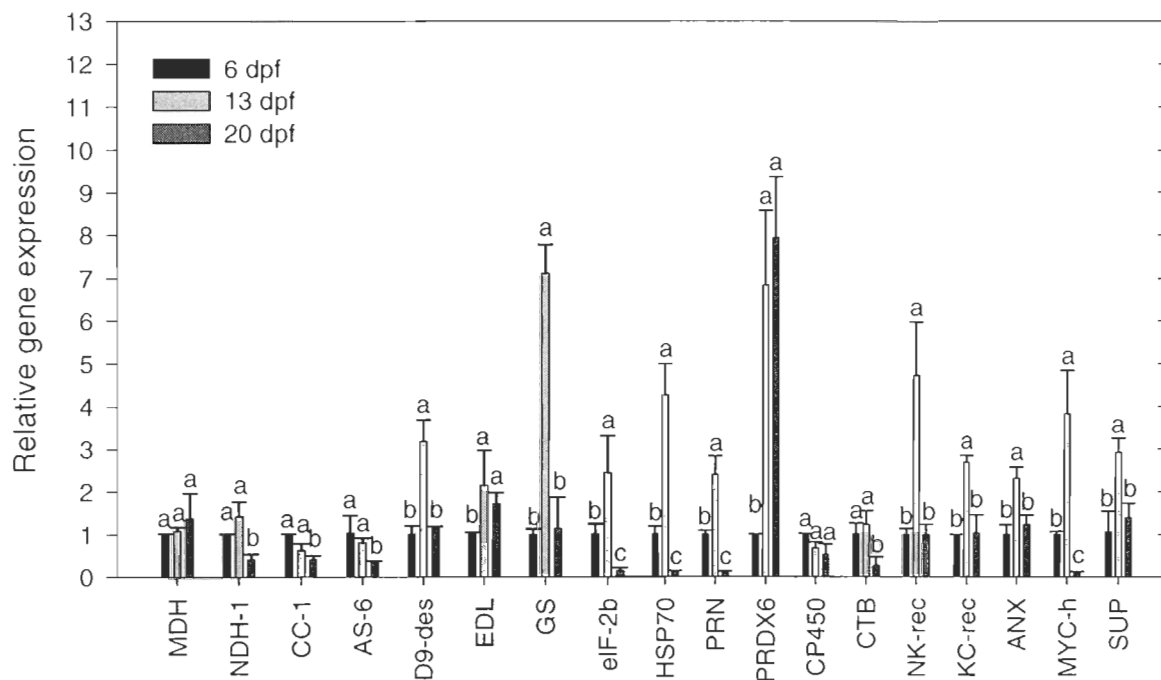


Figure 3.4. Evolution of transcript abundance in *Crassostrea virginica* larvae as a function of development time in seawater untreated with an antibiotic, where a massive mortality was observed at 20 dpf. Relative gene expression data were estimated by comparison with the level measured in 6-day-old larvae. Data are means \pm SD; see Table 3.1 for gene abbreviations. Different letters indicate significant differences.

Discussion

Mortality emergence and variation of gene expression

In the present study, we report, for the first time, molecular and physiological responses of oyster larvae during massive mortality process, particularly at the metabolism, immunity, cellular stress and cell regulation levels. Due to the microscopic size of pelagic larvae, the study of immunity at cellular level is very difficult, but we showed that the use of relative gene expression regulation is a powerful tool. As the transcript level is equilibrium between production and degradation, it is indeed not possible to translate

directly to cellular activity, but observed changes of gene expression can be related to their putative functions. The emergence of massive mortality was characterized by a decrease of relative gene expression of 15 out of 18 genes in moribund larvae (untreated larvae that showed subsequent mortality at 20 dpf). The reason of these decreases could be explained by endogen regulation of DNA transcription and/or by the degradation of larval RNA content by pathogen host-degenerative enzymes, toxins and oxidative stress. As described in Genard *et al.* (2011), higher lipids peroxidation in moribund larvae was measured when massive mortality occurred suggesting a higher oxidative stress which could induce nucleic acid degradation. However, despite the general pattern of decrease at 20 dpf, nine genes had similar or higher transcripts levels at 20 dpf than those measured at 6 dpf and height genes showed similar or higher expression than measured in antibiotic treatment at 20 dpf. Furthermore, expression levels are relative to those of the housekeeping ribosomal 18s gene. Thus, hypothesis of global RNA degradation cannot explain our observations. Our results rather suggest that regulation processes could be also implicated in the decrease of transcript levels in moribund larvae. Beside the down-regulation at 20 dpf, we measured that, comparatively to antibiotic control, 9 genes was up-regulated at 13 dpf, suggesting that gene regulation began one week before mortality emergence and depended to the infection intensity. Recently, the impact of infection intensity on gene regulation was demonstrated in adults of *C. virginica* challenged by *P. marinus* (Wang *et al.* 2010). Indeed these authors observed that on the 807 studied genes regulated during infection, 488 genes were only regulated in the light infected group, 226 genes in the heavily infected group and 309 on both groups. Similarly, Chaney and Gracey (2011) found 124 up-regulated genes associated to massive mortality emergence from haemolymph of *C. gigas*.

Genes related to metabolism

For genes related to energy metabolism, moribund larvae at 20 dpf had lower transcript abundances of *NDH-1*, *CC-1*, and *AS-6* but not of *MDH*. The NADH dehydrogenase subunit 1 (*NDH-1*), cytochrome c1 (*CC-1*), and ATP synthase f0 subunit 6 (*AS-6*) genes code for protein subunits of electron chain transport complex I, III, and V,

respectively. Interestingly, as described in Genard *et al.* (2011), we observed a decline in citrate synthase (CS) and cytochrome oxidase (CCO) activity along with these other molecular changes in moribund larvae. The CS and CCO enzymes are involved in energy production, illustrating the correspondence between the molecular and physiological energy response to mortality emergence. As discussed previously in the companion paper (Genard *et al.* 2011), the decreased metabolic activity could be associated with a metabolic depression explained by a lack of energy substrate (principally lipids and proteins) due to limited feeding and a higher energy demand resulting from the immune process activation. To our knowledge, little information is yet available on the regulation of genes related to energy metabolism as a function of feeding activity in bivalves (Bacca *et al.* 2005). Salem *et al.* (2007) demonstrated that genes from complex III (Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductases), complex IV (Cytochrome c oxidase), and complex V (ATP synthase) were down-regulated in starved rainbow trout.

The metabolic depression associated with mortality emergence could also be suggested by the down regulation of two genes related to protein metabolism (*GS* and *eIF-2B*). Glutamine synthetase (GS) is a ubiquitous enzyme involved in complex cellular functions, including nitrogen metabolism, ammonia detoxification, and the conversion of glutamate to glutamine, which is the most abundant non-essential amino acid used for the synthesis of amino acids, sugars, and glucosamine-6-phosphate. Tanguy *et al.* (2005b) detected transcripts for glutamine synthetase in all developmental stages of *C. gigas*. These authors concluded that glutamine produced by glutamine synthetase is required in the formation of amino acids, purines, and pyrimidines, all of which are essential for protein synthesis during oogenesis and embryogenesis. Previous studies on *Drosophila melanogaster* showed that the loss of glutamine could depress both protein and DNA synthesis and lead to a variety of mitotic defects in this embryonic system (Frenz and Glover, 1996). Translational initiation factor 2 (eIF2) is a multifunctional heterotrimeric G protein that delivers the initiator tRNA to the P site of a small ribosomal subunit in a GTP-dependent manner and plays a crucial role in the regulation of the initiation step of protein synthesis (Proud, 2005; Suragani *et al.* 2006). Thus, the low *GS* and *eIF-2B* transcript

abundances measured in moribund larvae could reflect a decrease in protein synthesis; this has been observed in marine snails when temperatures approach lethal levels (Tomanek and Somero, 1999). This hypothesis is supported by our biochemical results: we observed that moribund larvae stopped protein accumulation (Genard *et al.* 2011).

The impact of massive mortality on lipid metabolism was illustrated by the lower transcript abundance of endothelial lipase (EDL) in moribund larvae. EDL is a phospholipase with a low but detectable triacylglycerid lipase activity. This enzyme has a high affinity for high-density lipoprotein (HDL) phospholipids (Hirata *et al.* 2000; Ishida *et al.* 2003). In addition, it has been demonstrated that EDL efficiently cleaves saturated as well as unsaturated fatty acids from HDL phospholipids, making them available for incorporation into endogenous lipids (Strauss *et al.* 2003; Gauster *et al.* 2005; Kratky *et al.* 2005). To our knowledge, no studies have been done on the function of EDL in bivalves. Nevertheless, the presence and importance of HDL have been demonstrated in molluscs, bivalves, and crustaceans (Dreon *et al.* 2002; Heras and Pollero, 2002; Walker *et al.* 2003), suggesting that EDL could play a significant function in fatty acid remodelling and lipid synthesis. Interestingly, we observed a good correspondence between *EDL* expression and phospholipid content, which was reported in the companion paper (Genard *et al.* 2011), suggesting a putative role of EDL in phospholipid accumulation in bivalves.

The mortality event was also characterized by a higher content of 22:2 non-methylated interrupted fatty acids (NMI FA) in untreated larvae at 20 dpf compared to untreated larvae at 13 dpf as well as larvae treated with the antibiotic (Genard *et al.* 2011). The delta9-desaturase (*D9-des*) implicated respectively in the biosynthesis of 16:1 ω 9 and 18:1 ω 9 from palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0) (Ntambi, 1999; Miyazaki *et al.* 2003), is involved in NMI biosynthesis. The pathways consist of delta9-desaturation and the elongation of 16:0 and 18:0, respectively, into 20:1 ω 7 and 20:1 ω 9. Thereafter, a C20-delta5 desaturation converts them, respectively, into 5,13-20:2 and 5,11-20:2 (20:2 NMI_i and _j), which are finally elongated into 7,15-22:2 and 7,13-22:2 (22:2 NMI_i and _j), respectively (Kraffe *et al.* 2004, Barnathan 2009). *D9-des* showed a significant peak of expression at 13

dpf in both treatments. As measured in Genard *et al.* (2011), this peak of expression corresponded to an accumulation of 16:1n9 and 18:1n9 in neutral lipids, but no correspondences were found with NMI FA profiles. Although *D9-des* seems to modify the fatty acid profile of neutral lipids, the reason for this over-expression peak at 13 dpf remains unclear. The lack of significant differences between treatments seems to indicate that the variation in *D9-des* gene expression was related more to ontogenic changes than to an immune response.

Cellular stress and immunity

As discussed in the companion paper (Genard *et al.* 2011), the higher activity levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) in untreated larvae at 13 dpf led us to suggest an activation of antioxidant defences before the mass mortality event. We had hypothesized that the increased antioxidant activity was induced to manage reactive oxygen species (ROS) that can be accumulated during an immune response, thus avoiding oxidative damage to the cell. In untreated larvae, the antioxidant defence activation at 13 dpf was confirmed by the higher transcript abundance of peroxiredoxin 6 (PRDX6), a key antioxidant enzyme that protects the cells from the damaging action of H₂O₂. Recently, the activation of genes associated to PRDX6 in particular and to antioxidant processes in general was observed in *C. virginica* after *P. marinus* infection (Wang *et al.* 2010). Moreover, the over-expression of peroxiredoxins genes accompanied by oxidative stress has been demonstrated in many pathological states, illustrating the importance of peroxiredoxins in the vital activity of cells (Shuvaeva *et al.* 2009), probably to catalyze the reduction of organic and phospholipid peroxides (Manevich *et al.* 2009; Shuvaeva *et al.* 2009).

Simultaneous with the higher *PRDX6* transcript level, we found an over-expression at 13 dpf of two other genes involved in cellular stress: Heat Shock Protein 70 (*HSP70*) and Pernin (*PRN*). *HSP70* is a stress-response protein implicated in cytoprotection that acts as a molecular chaperone, preventing premature folding of proteins and aiding in the translocation to organelles. Under stress conditions, they are believed to bind to damaged or

misfolded polypeptides, either facilitating their repair or targeting irreparably damaged proteins for degradation (Lindquist and Craig, 1988; Huang *et al.* 2001; Daugaard *et al.* 2007). HSP70-mediated cytoprotective effects have been shown in pathological conditions in aquatic organisms. Increased levels of HSP70 in various tissues were observed in fish species exposed to bacterial pathogens (Ackerman and Iwana, 2001; Deane *et al.* 2004). In bivalves, studies showed that the expression of *HSP70* increased in *C. virginica* haemocytes with increasing intensities of *Perkinsus* infection (Brown *et al.* 1993); similar observations were made for *HSP70* RNA transcripts in the haemocytes of scallops infected by *Vibrio anguillarum* (Song *et al.* 2006). Moreover, interactions were found between oxidative stress, antioxidants, and *HSP70* expression (Calabrese *et al.* 2000; Calabrese *et al.* 2001). Guo *et al.* (2007) showed that HSP70 can regulate the cellular redox status by modulating the activities of glutathione-related enzymes (glutathione peroxidase and reductase) in response to hypoxic and ischemic stress. Pernin, also called cavortin and first discovered in the mussel *Perna viridis* (Scotti *et al.* 2001), is a non-pigmented, glycosylated protein exceptionally rich in histidine and aspartic acid; these amino acids are both known to participate in the binding of divalent metal cations, principally Fe, suggesting that they function as an iron chelator or chaperone. In addition, Pernin acts as a serine protease inhibitor and has sequences clearly homologous to the active-site domain of Cu–Zn SODs (superoxide dismutases) (Scotti *et al.* 2001). Pernin has the capacity to inhibit *in vitro* *P. marinus* growth (Gauthier and Vasta, 1994). Tanguy *et al.* (2004) identified a gene coding for a Pernin among *C. virginica* haemocytes and observed an increase of mRNA expression after 45 days of *P. marinus* exposure, suggesting the possible involvement of Pernin in the response to parasite infection. Moreover, Huvet *et al.* (2004) suggested that cavortin (or pernin) can act in cellular host protection against the reactive oxygen intermediate (ROI) in *C. gigas* infected by *Vibrio splendidus*. The properties of HSP70 and Pernin indicate that these proteins could play similar functions in cytoprotection and immunity. As for *PRDX6*, we can hypothesize that the over-expression at 13 dpf in untreated larvae enhances cells protection against reactive oxygen species or intermediates (ROS or ROI) produced during the immune response. Inversely, the down-

expression at 20 dpf could indicate a decline of cytoprotective abilities as supported by the higher lipids peroxidation level observed in moribund larvae.

In untreated larvae, the evolution of MYC homologue (*MYC-h*) transcript abundance was significantly correlated with the expression profiles of *HSP70* and *PRN*, suggesting that *MYC-h* expression was similarly regulated when mortality event occurred. MYC-h belongs to the proto-oncogene family and is involved in the control of metabolism, protein biosynthesis, cell cycle regulation, cell adhesion, and the cytoskeleton (Dang *et al.* 2006); it is also able to elicit the adverse process programmed cell death (Evan *et al.* 1992; Nilsson *et al.* 2003). In *C. gigas*, the MYC homologue appeared to be up-regulated after 21 days of hydrocarbon exposure (Boutet *et al.* 2004) and under hypoxic conditions (David *et al.* 2005). According to these authors, *MYC-h* over-expression could enhance cell protection. In this context, like *HSP70* and *PRN*, the over-expression at 13 dpf could be linked to increased cell protection, while the down-expression at 20 dpf reflected the decrease of cytoprotective abilities in moribund larvae.

Activation of the immune response can be seen in the over-expression at 13 dpf of two genes linked to pathogen recognition and natural killer (or killer cell) regulation: NKR-P1B natural killer receptor (*NK-rec*) and killer cell lectin-like receptor (*KC-rec*). Both genes were similar to various C-type lectin receptors (Jenny *et al.* 2002). Lectins are specialized proteins that have the ability to recognize specific pathogen-associated carbohydrate structures and cause agglutination of cells, promote cellular adhesion, and mediate the innate immune response (Drickamer, 1999; Geijtenbeek *et al.* 2004; McGreal *et al.* 2004). They have been detected in several bivalves species (Minamikawa *et al.* 2004; Takahashi *et al.* 2008; Yamaura *et al.* 2008), and their implication in immune properties have been demonstrated (Allam *et al.* 2006; Mydlarz *et al.* 2006; Ma *et al.* 2007). Recently, the activation of C-type lectin related genes was found after *P. Marinus* infection in adults of *C. virginica* (Wang *et al.* 2010).

The presence of an immune response could also be suggested by the level of cathepsin B (*CTB*) transcript in untreated larvae at 6 and 13 dpf. Cathepsin are lysosomal

cysteine proteinases involved in intracellular protein degradation. With respect to invertebrate immune function, the roles of proteinases and proteinase inhibitor have been well demonstrated in the regulation of melanization, mediated by the prophenoloxidase system, and hemolymph coagulation (Soderhall *et al.* 1998; Kanost, 1999; Iwanaga and Lee, 2005). EST of cathepsins were identified in *C. virginica* (embryo and haemocytes) by Jenny *et al.* (2002), in the haemocytes of bacterial-challenged *C. gigas* (Gueguen *et al.* 2003) or before mass mortality occurrence in the same specie (Chaney and Gracey, 2011). In regard to these cathepsin properties, the high transcript abundance measured between 6 and 13 dpf in untreated larvae could be linked to high protein degradation induced by the immune response while the decline at 20 dpf could be related to the degradation of immune abilities.

Annexin (*ANX*) and RAS suppressor (*SUP*) also showed an over-expression at 13 dpf that could be associated with the activation of immune response. The annexins are a family of closely related calcium- and membrane-binding proteins found in most eukaryotic cell types. Despite their structural and biochemical similarities, annexins have diverse functions in cellular activities that include vesicle trafficking, cell division, apoptosis, inflammatory response, calcium signalling, and growth regulation. *ANX* acts as a secondary mediator of anti-inflammatory glucocorticoids (Perretti *et al.* 2008). Like glucocorticoids, *ANX* exerts profound inhibitory effects on both neutrophil and monocyte migration in inflammation (Perretti *et al.* 2008) and can affect many components of the inflammatory reaction besides the metabolism of arachidonic acid and the synthesis of eicosanoids (Parente and Solito, 2004) Moreover, *ANX* has been recently identified as one of the “eat-me” signals that allows apoptotic cells to be recognized and ingested by phagocytes, leading to the safe post-apoptotic clearance of dead cells (Parente and Solito, 2004; Perretti *et al.* 2004). RAS suppressor (*SUP*) is a member of RAS effectors thought to regulate cell proliferation and apoptosis involved in tumor regulation (Agathangelou *et al.* 2005; Kumari *et al.* 2009). RAS associated genes were known to be involved *Neoplasia* in *M. trossulus* (Ciocan *et al.* 2006), suggesting a putative function during pathology. While little is known about *ANX* and *SUP* functions in oyster larvae, the over-expression of these two genes at 13 and 20 dpf

(the only ones) in moribund larvae indicate that both played an important function during pathogenic infection, probably to manage the inflammatory response and the apoptotic process as suggested in adult oysters during *P. marinus* infection in *C. virginica* (Wang *et al.* 2010) or before mass mortality in *C. gigas* (Chaney and Gracey, 2011).

Conclusion

To our knowledge, this study is the first to report the molecular and physiological processes of bivalve larvae reared in contrasting microbial environments where massive mortality occurred. Comparisons of biochemical and physiological results provided additional evidence supporting previous suppositions, such as the metabolic depression in moribund larvae and the activation of immune response and antioxidant defences before the appearance of massive mortality. Moreover, our results illustrated the importance of cytoprotection processes, inflammatory response management, and cell regulation during a massive mortality event. Recent development of genome-wide expression profiling using microarrays (e.g. Fleury *et al.*, 2010, Sussarellu *et al.*, 2010, Chaney and Gracey 2011) or whole transcriptome shotgun sequencing will provide further insights on these processes.

Acknowledgments

The authors are grateful to IRZC staff for oyster production. Thanks are addressed to Laure Devine for linguistic revision. This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Réseau Aquacole du Québec to F.P. and R.T.

References cited

Ackerman, P.A., Iwama, G.K., 2001. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to *vibriosis*. *J. Aquat. Anim. Health* 13, 173-180.

Agathangelou A., Cooper W. N., Latif F., 2005. Role of the ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res.* 65, 3497-3508.

Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following in vivo challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 384-397.

Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.Y., Delaporte, A., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A., Moal, J., 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 140, 635-646.

Barnathan, G., 2009. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie* 91, 671-678.

Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147-157.

Brown, D.C., Bradley, B.P., Paynter, K.T., 1993. The physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Induction of stress proteins. *J. Shellfish. Res.* 12, 135-136.

Calabrese, V., Copani, A., Testa, D., Ravagna, A., Spadaro, F., Tendi, E., Nicoletti, V.G., Stella, A.M.G., 2000. Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: Effect on heat shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance. *J. Neurosci. Res.* 60, 613-622.

Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Bates, T.E., Dinotta, F., Micali, G., Giuffrida, S.A.M., 2001. Induction of heat shock protein synthesis in human skin fibroblasts in response to oxidative stress: Regulation by a natural antioxidant from rosemary extract. *Int. J. Tissue React.-Exp. Clin. Asp.* 23, 51-58.

Ciocan C. M., Moore J. D., Rotchell J. M., 2006. The role of ras gene in the development of haemic neoplasia in *Mytilus trossulus*. *Mar. Environ. Res.* 62, S147-S150.

Chaney, M.L., Gracey, A.Y., 2011. Mass mortality in Pacific oysters is associated with a specific gene expression signature. *Mol. Ecol.* 20, 2942-2954.

Cheney, D.P., Macdonald, B.F., Elston, R.A., 2000. Summer mortality of pacific oysters, *Crassostrea Gigas* (thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in puget sound, Washington, 1988. *J. Shellfish Res.* 19, 353-359.

Collin, H., Meistertzheim, A.L., David, E., Moraga, D., Boutet, I., 2010. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. *J. Exp. Biol.* 213, 4010-4017.

Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., Li, F., 2006. The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16, 253-264.

Daugaard, M., Rohde, M., Jaattela, M., 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *Febs Lett.* 581, 3702-3710.

David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *F. Journal* 272, 5635-5652.

Deane, E.E., Li, J., Woo, Y.S., 2004. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. *Dis. Aquat. Org.* 62, 205-215.

Dreon, M., Lavarias, S., Garin, C.F., Heras, H., Pollero, R.J., 2002. Synthesis, distribution, and levels of an egg lipoprotein from the apple snail *Pomacea canaliculata* (*Mollusca : Gastropoda*). *J. Exp. Zool.* 292, 323-330.

Drickamer, K., 1999. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 585-590.

Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., Hancock, D.C., 1992. Induction Of Apoptosis In Fibroblasts By C-Myc Protein. *Cell* 69, 119-128.

Fleury, E., Huvet, A., Lelong, C., de Lorgeril, J., Boulo, V., Gueguen, Y., Bachere, E., Tanguy, A., Moraga, D., Fabioux, C., Lindeque, P., Shaw, J., Reinhardt, R., Prunet, P., Davey, G., Lapegue, S., Sauvage, C., Corporeau, C., Moal, J., Gavory, F., Wincker, P., Moreews, F., Klopp, C., Mathieu, M., Boudry, P., Favrel, P., 2009. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* 10, 341-355.

Frenz, L.M., Glover, D.M., 1996. A maternal requirement for glutamine synthetase I for the mitotic cycles of syncytial *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* 109, 2649-2660.

Gauster, M., Rechberger, G., Sovic, A., Horl, G., Steyrer, E., Sattler, W., Frank, S., 2005. Endothelial lipase releases saturated and unsaturated fatty acids of high density lipoprotein phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* 46, 1517-1525.

Gauthier, J.D., Vasta, G.R., 1994. Inhibition Of In-Vitro Replication Of The Oyster Parasite *Perkinsus-Marinus* By The Natural Iron Chelators Transferrin, Lactoferrin, And Desferrioxamine. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 277-286.

Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Engering, A., t Hart, B.A., van Kooyk, Y., 2004. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 33-54.

Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D., Tremblay, R., 2011. Physiological and biochemical changes during premetamorphic development in American oyster *Crassostrea virginica* in relation to mortality emergence. *Aquat. Living Resour.* In Press.

Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., de Lorgeril, J., Romestand, B., Bachere, E., 2007. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 332-339.

Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E., Escoubas, J.M., 2003. Immune gene discovery by

expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139-145.

Guo, S.H., Wharton, W., Moseley, P., Shi, H.L., 2007. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones* 12, 245-254.

Heras, H., Pollero, R.J., 2002. Lipoproteins from plasma and perivelline fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biocell* 26, 111-118.

Hirata, K., Ishida, T., Matsushita, H., Tsao, P.S., Quertermous, T., 2000. Regulated expression of endothelial cell-derived lipase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 90-93.

Huang, L., Mivechi, N.F., Moskophidis, D., 2001. Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: Analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8575-8591.

Huvet, A., Herpin, A., Degremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211-220.

Ishida, T., Hirata, K., Kojima, Y., Choi, S., Cooper, A., Quertermous, T., Yokoyama, M., 2003. Altered expression of endothelial cell-derived lipase in diseased vessel wall and its impact on HDL metabolism. *Atheroscler. Suppl.* 4, 232-233.

Iwanaga, S., Lee, B.L., 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 128-150.

Jenny, M.J., Chapman, R.W., Mancina, A., Chen, Y.A., McKillen, D.J., Trent, H., Lang, P., Escoubas, J.M., Bachere, E., Boulo, V., Liu, Z.J., Gross, P.S., Cunningham, C., Cupit, P.M., Tanguy, A., Guo, X., Moraga, D., Boutet, I., Huvet, A., De Guise, S.,

Almeida, J.S., Warr, G.W., 2007. A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. Mar. Biotechnol. 9, 577-591.

Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Lacy, E.R., Lewitus, A.J., Kempton, J.W., Gross, P.S., Warr, G.W., Chapman, R.W., 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. Mar. Biotechnol. 4, 81-93.

Jenny, M.J., Warr, G.W., Ringwood, A.H., Baltzegar, D.A., Chapman, R.W., 2006. Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): Ontogeny and differential expression in response to different stressors. Gene 379, 156-165.

Kanost, M.R., 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Dev. Comp. Immunol. 23, 291-301.

Kraffe, E., Soudant, P., Marty, Y., 2004. Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. Lipids 39, 59-66.

Kratky, D., Zimmermann, R., Wagner, E.M., Strauss, J.G., Jin, W.J., Kostner, G.M., Haernerle, G., Rader, D.J., Zechner, R., 2005. Endothelial lipase provides an alternative pathway for FFA uptake in lipoprotein lipase-deficient mouse adipose tissue. J. Clin. Invest. 115, 161-167.

Kumari G., Mahalingam S., 2009. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2) mediated phosphorylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling and cell growth control of Ras-associated tumor suppressor protein, RASSF2. Exp. Cell Res. 315, 2775-2790.

Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The Heat-Shock Proteins. Annu. Rev. Genet. 22, 631-677.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. Methods 25, 402-408.

Ma, T., Chan, S., 2007. Characterization of a shrimp lectin: potential role in crustacean innate immunity. Febs J. 274, 368-368.

Manevich, Y., Shuvaeva, T., Dodia, C., Kazi, A., Feinstein, S.I., Fisher, A.B., 2009. Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 139-149.

McGreal, E.P., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol. Immunol.* 41, 1109-1121.

Meistertzheim, A.L., Tanguy, A., Moraga, D., Thebault, M.T., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *Febs J.* 274, 6392-6402.

Minamikawa, M., Hine, M., Russell, S., Huber, P., Duignan, P., Lumsden, J.S., 2004. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chiletin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 463-476.

Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., Roch, P., 2000. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275, 12954-12962.

Miyazaki, M., Ntambi, J.M., 2003. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68, 113-121.

Mydlarz, L.D., Jones, L.E., Harvell, C.D., 2006. Innate immunity environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37, 251-288.

Nilsson, J.A., Cleveland, J.L., 2003. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22, 9007-9021.

Ntambi, J.M., 1999. Mechanisms of control of gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Faseb J.* 13, A874-A874.

Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223.

Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17, 477-498.

Parente, L., Solito, E., 2004. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm. Res.* 53, 125-132.

Perretti, M., Flower, R.J., 2008. Anti-inflammatory glucocorticoids and annexin 1, in: Rossi, A.G, Sawatzky, D.A., (Eds),. *The Resolution of Inflammation*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp 141-158.

Perretti, M., Solito, E., 2004. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 507-510.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29.

Proud, C.G., 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 3-12.

Quilang, J., Wang, S.L., Li, P., Abernathy, J., Peatman, E., Wang, Y.P., Wang, L.L., Shi, Y.H., Wallace, R., Guo, X.M., Liu, Z.J., 2007. Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers. *Bmc Genomics* 8, 157-167.

Salem, M., Silverstein, J., Iii, C.E.R., Yao, J., 2007. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bmc Genomics* 8, 328-343.

Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, H., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, S., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Gereth, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227-243.

Scotti, P.D., Dearing, S.C., Greenwood, D.R., Newcomb, R.D., 2001. Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (*Bivalvia* : *Mytilidae*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 128, 767-779.

Seo, J.K., Crawford, J.M., Stone, K.L., Noga, E.J., 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1998-2004.

Shuvaeva, T.M., Novoselov, V.I., Fesenko, E.E., Lipkin, V.M., 2009. Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 35, 523-537.

Soderhall, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23-28.

Song, L.S., Wu, L.T., Ni, D.J., Chang, Y.Q., Xu, W., Xing, K.Z., 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 335-345.

Strauss, J.G., Hayn, M., Zechner, R., Levak-Frank, S., Frank, S., 2003. Fatty acids liberated from high-density lipoprotein phospholipids by endothelial-derived lipase are incorporated into lipids in HepG2 cells. *Biochem. J.* 371, 981-988.

Suragani, R., Ghosh, S., Ehtesham, N.Z., Ramaiah, K.V.A., 2006. Expression and purification of the subunits of human translational initiation factor 2 (eIF2): Phosphorylation of eIF2 alpha and beta. *Protein Express. Purif.* 47, 225-233.

Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., Moraga, D., 2010. Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Mar. Genom.* 3, 133-143.

Takahashi, K.G., Kuroda, T., Muroga, K., 2008. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 150, 45-52.

Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra, C., Pina, B., Bachere, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., Boutet, I., Cancela, L., Dossat, C., Favrel, P., Huvet,

A., Jarque, S., Jollivet, D., Klages, S., Lapegue, S., Leite, R., Moal, J., Moraga, D., Reinhardt, R., Samain, J.F., Zouros, E., Canario, A., 2008. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* 408, 27-36.

Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005a. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *Febs J.* 272, 390-403.

Tanguy, A., Boutet, I., Moraga, D., 2005b. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression* 1681, 116-125.

Tanguy, A., Guo, X.M., Ford, S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C-gigas*) oysters. *Gene* 338, 121-131.

Tirape, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandebulcke, F., Boulo, V., 2007. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 859-873.

Tomanek, L., Somero, G.N., 1999. Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: Implications for limits of thermotolerance and biogeography. *J. Exp. Biol.* 202, 2925-2936.

Tikunov, A. P., Johnson, C. B., Lee, H., Stoskopf, M. K., Macdonald, J. M., 2010. Metabolomic investigations of American oysters using ¹H-NMR Spectroscopy. *Mar. Drugs* 8, 2578 - 2596.

Travers, M.A., Meistertzheim, A.L., Cardinaud, M., Friedman, C.S., Huchette, S., Moraga, D., Paillard, C., 2010. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*,

during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. J. Invertebr. Pathol. 105, 289-297.

Wang, S.L., Peatman, E., Liu, H., Bushek, D., Ford, S.E., Kucuktas, H., Quilang, J., Li, P., Wallace, R., Wang, Y.P., Guo, X.M., Liu, Z.J., 2010. Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. Fish Shellfish Immunol. 29, 921-929.

Walker, A., Ando, S., Lee, R.F., 2003. Synthesis of a high-density lipoprotein in the developing blue crab (*Callinectes sapidus*). Biol. Bull. 204, 50-56.

Yamaura, K., Takahashi, K.G., Suzuki, T., 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. B. 149, 168-175.

Zapata, M., Tanguy, A., David, E., Moraga, D., Riquelme, C., 2009. Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. Gene 442, 37-46.

Chapitre 3

Vue du physiologique au moléculaire des changements associés à une exposition à court terme à un pathogène bactérien chez des larves de *C. gigas*

Ce troisième article, intitulé « Molecular to physiological changes associated to short-term bacterial pathogen exposure in *C. gigas* larvae. », a été corédigé par moi-même, mon directeur Réjean Tremblay, mon codirecteur Fabrice Pernet et les chercheurs Philippe Miner, Jean Louis Nicolas, Pierre Boudry et Dario Moraga. Il est en attente des dernières corrections des co-auteurs avant sa soumission dans *Proceeding of Royal Society of London B*. Ma contribution à ce travail a été l'essentiel des échantillonnages, des analyses et des statistiques ainsi que l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article. Réjean Tremblay, Fabrice Pernet et Pierre Boudry ont fourni l'idée originale et conçu le plan de l'étude, et ont aussi aidé à la coordination de la recherche et à l'écriture du manuscrit. L'élevage des larves et la production des bactéries ont été réalisés avec l'aide de Philippe Miner. Jean Louis Nicolas et Dario Moraga ont aidé à la mise au point des protocoles en microbiologie et en génomique respectivement, ainsi qu'à la révision de l'article. Des versions abrégées de cet article ont été présentées au 12th International Conference on Shellfish Restoration à l'île du Prince Edouard en 2009 et au carrefour maritime de Rimouski (Canada) en 2009.

RÉSUMÉ

Pendant le développement larvaire, les invertébrés marins et plus spécifiquement les bivalves, sont particulièrement stimulés par leur environnement. Le mode alimentaire des larves les expose à une multitude de microorganismes qui peuvent s'avérer des vecteurs de maladies. Les infections ont des conséquences importantes sur le développement des larves et sont dépendantes d'une manière générale aux interactions entre l'hôte et les pathogènes. Cependant, la nature des changements que peuvent subir les larves suite à une infection n'est pas connue. C'est pourquoi, dans ce travail, une approche multidisciplinaire composée d'analyses physiologiques, biochimiques et moléculaires a été utilisée pour évaluer l'impact d'un challenge bactérien sur le métabolisme énergétique, la composition en lipides, le stress cellulaire et la réponse immunitaire chez des larves de *C. gigas*. Nos résultats suggèrent qu'une exposition à un pathogène induit (1) une diminution de l'activité alimentaire, (2) des changements dans l'activité du métabolisme énergétique (utilisation des réserves et régulation des enzymes et gènes associés), (3) une modification du contenu en lipides, (4) l'activation des défenses antioxydantes et des processus de cytoprotection et (5) l'activation de la réponse immunitaire (reconnaissance du non-soi, NF- κ B, hématopoïèse, peptides antimicrobiens et eicosanoïdes). Cette vision globale des changements associés à un challenge bactérien ouvre la voie à de futures études dont l'objectif serait d'améliorer les connaissances sur la réponse larvaire face à une infection chez les invertébrés marins.

MOLECULAR TO PHYSIOLOGICAL CHANGES ASSOCIATED TO SHORT-TERM BACTERIAL PATHOGEN EXPOSURE IN *C. GIGAS* LARVAE

Genard Bertrand¹, Miner Philippe², Nicolas Jean-Louis², Moraga Dario³, Boudry Pierre², Pernet Fabrice⁴, and Tremblay Réjean¹

1 Institut des sciences de la mer, Université du Québec à Rimouski, 310, allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada

2 Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, UMR M100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Technopole de Brest-Iroise BP 70 29280, Plouzané, France

3 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France

4 Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, Laboratoire Environnement Ressources en Languedoc-Roussillon, Bd Jean Monnet, Sète, France

Keywords : *Crassostrea gigas*, bacterial challenge, larvae, lipids, metabolism, immunity, cellular stress.

Abstract

During larval development, marine invertebrates, especially bivalves, are particularly challenged by their environment. Their feeding mode exposes larvae to a large number of microorganisms that can be disease vectors. Infection has important consequences on larval development and depends to a large extent on host–pathogen interactions. However, changes associated with pathogen exposure in larval stages are poorly understood. In the present study, a multivariate approach including physiological, biochemical, and molecular analyses was used to investigate changes in energy metabolism, lipid remodelling, cellular stress, and immune response incurred by *Crassostrea gigas* larvae after bacterial challenge. Our results suggest that pathogen stimulation induced (1) a decline of feeding activity, (2) changes in energy metabolism (use of energy reserves and regulation of associated enzymes and genes), (3) lipids remodelling, (4) activation of antioxidant defenses and the cytoprotective pathway, and (5) activation of immune responses (non-self recognition, NF- κ B pathway, haematopoiesis, antimicrobial peptides, and eicosanoides). This overall view of the changes associated with bacterial challenge opens the way to further investigations aiming to improve our knowledge related to the response of marine invertebrate larvae to pathogen exposure.

Introduction

Marine invertebrates, especially bivalves, are particularly challenged by their environment. Due to their filtering activity, bivalves gather a large number of microorganisms; these include both sources of sustenance as well as disease vectors. Infections can have serious consequences on the development of larval invertebrates [1], and these consequences depend to a large extent on host–pathogen interactions. When a pathogen invades a host, multiple reactions occur that are initiated both by the pathogen in an attempt to survive and by the host in an attempt to eliminate the invader. Bivalves have efficient defense strategies to protect against pathogen attack [2]. However, the ontogeny of the defense system to pathogen exposure is poorly understood in marine invertebrates, especially bivalves. Bivalve adults possess both cellular and humoral defense mechanisms that act together to kill and eliminate infecting bacteria [3]. Haemocytes are responsible for cell-mediated immunity through phagocytosis and various cytotoxic reactions, such as the release of lysosomal enzymes and antimicrobial peptides, and the production of oxygen metabolites [2, 4]. Although immunity has been well investigated in adult bivalves, the immune properties of larvae remain poorly understood. Elston and Leibovitz [5] observed phagocytes (described as coelomocytes) containing bacterial fragments in the visceral cavity of *C. virginica* veliger larvae. In *Mytilus galloprovincialis*, the antimicrobial peptides mytilin and defensin have been found during and after larval metamorphosis. *Mytilus edulis* larvae are capable of producing enzymes generally associated with haemocyte activity [7], and haemocytes have been detected in trochophore and veliger larvae from the same specie [8]. Similarly, lysozyme-like and hydrolytic enzyme activities were present in *C. gigas* larvae and juveniles [9]. Recently, Tirape *et al.* [10] studied the expression of 18 immune-related genes during ontogeny and bacterial challenge in *C. gigas* and proposed that the immune regulation pathway Rel/NF- κ B occurred in larval stages. In the same study, the expression patterns of four genes (*Cg-timp*, *Cg-tal*, *Cg-EcSOD*, *Drac3*) suggested that haemocytes appear during the gastrula–trochophore stages. In bivalves, the production of reactive oxygen species (ROS) during infection has been suggested to be a

host defense mechanism to counter attacks of pathogenic bacteria [11-14]. Indeed, recent studies show that Pacific oysters infected with *Vibrio* exhibit an enhanced production of ROS by hemocytes [12, 15]. Bivalve haemocytes seem to respond to bacterial stimulation with a burst of respiratory activity in a manner resembling the respiratory burst of mammalian phagocytes, resulting in the generation of various free radicals (ROS) that eliminate the phagocytized material. These microbicidal oxygen derivatives are detrimental to oyster cells. Therefore, ROS are controlled by antioxidant defense systems to limit tissue peroxidation. Several studies have proposed the importance of antioxidant defenses during infection to explain summer mortality in oysters [16-17]. These authors observed that oysters susceptible to summer mortalities exhibit higher ROS levels compared to those of resistant animals before the mortality event, thus linking mortality with the antioxidant disorder of the sensitive oysters. Similarly, Genard *et al.* [18] showed that an increase in oxidative stress and the activation of antioxidant defenses coincided with the occurrence of massive mortality at the veliger stage in *C. virginica*.

Pathogen exposure could induce marked changes in larval energy metabolism. Disease and massive mortalities in oysters have often been associated with a decline of feeding activity [18-20]. Genard *et al.* [18] showed that the decline in feeding activity was associated with metabolic depression, as suggested by the low energy reserves and the decrease in activities related to energy metabolism. These results were supported by Flye-Sainte-Marie *et al.* [21], who suggested that the declining respiration rate of juvenile Manila clams with the development of brown ring disease symptoms could be interpreted as a compensatory reduction in the metabolic rate following the decrease of feeding activity (clearance rate). The nutritional status of larvae could be estimated by lipid content, mainly triacylglycerols (TAG), which constitute the main energy source during larval development [22-23]. Previous studies showed that TAG levels were higher in animals treated with an antibiotic than in non-treated controls, where significant mortality occurred [24]. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) are known to be essential for development of bivalve larvae, acting both to sustain growth and improve survival [25-26]. C₂₀ PUFAs, such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5[n-3]) and arachidonic acid (AA, 20:4[n-6]), are

precursors of eicosanoids, a group of highly biologically active hormones that includes prostaglandins, leukotrienes, and hydroxyeicosatetraenoic acids [27]. Eicosanoid production is associated with stressful situations, with excess eicosanoid production having been recorded under pathological conditions [28]. AA levels in sea scallops show a marked increase during the metamorphic stage, which coincides with elevated mortality and the establishment of pathogenic and opportunistic microbes in larval cultures [29]. In addition, haddock larvae show a marked increase in AA during the transition from a diet of rotifers to a diet of *Artemia*, presumably attributable to a stimulation of immune functions due to an increase in the bacterial load in the rearing system.

To improve our understanding of the larval response to pathogen stimulation, this study estimated the physiological, biochemical, and molecular changes induced during bacterial challenge in *Crassostrea gigas* larvae. Using multivariate analysis, we investigated the impact of pathogen challenge (1) on larval performance (estimated here by the mortality rate, growth, and feeding activity), (2) on energy metabolism, (3) on the content of protein, glucids, lipid classes, and fatty acids in larvae, (4) on antioxidant defense activity and lipid peroxidation, and (5) on the expression levels of candidate genes involved in energy metabolism, lipid metabolism, cellular stress, and immunity.

Methods

Rearing procedures

This project was conducted at the IFREMER hatchery in Brest (Brittany, France) and took place from mid-May to June 2008. Adult oysters *Crassostrea gigas* were collected at the experimental aquaculture center of Argenton (Brittany, France). When males and females reached sexual maturity, spawning was induced by thermal shock and the fertilized eggs were transferred to a 150 L cylindro-conical tank for 24 h at 20°C (10 eggs mL⁻¹). Larvae (20 ind. mL⁻¹ initially) were reared in the same kind of tank at 20°C in UV-treated filtered seawater (double cartridge-filtered: 1 µm and 0.5 µm) with gentle aeration for twelve days. Larvae were fed a mixture of T-ISO (*Isochrysis affinis galbana*)

and CHAETO (*Chaetoceros calcitrans*) at 60×10^3 and 30×10^3 algal cells mL^{-1} respectively. Microalgae were cultivated continuously in a 6 L glass container filled with filtered and sterilized seawater enriched with Conway medium [31] at 20°C with continuous irradiance and aeration (air/ CO_2 , 98.5/1.5%). The pathogen used for bacterial challenge was a strain (LPI 06/210) of *Vibrio corallilyticus* isolated from diseased oyster larvae. Prior to use in experiments, this *V. corallilyticus* strain that had been dry-frozen at -80°C was streaked onto marine agar gel to ensure purity then cultured in marine broth (Difco, Lawrence, KS, USA) and incubated at 25°C 24h prior to use. Bacteria were extracted from the culture medium by centrifugation then the pellet was removed and suspended in 10 mL of sterile seawater. Optical density was read at 600 nm and compared to a standard of sterile seawater so as to assess bacterial concentration.

Experimental design

Twelve days after fertilization, larvae were collected on a $100 \mu\text{m}$ square mesh filter, counted, pooled, and divided equally into eight 10 L carboys ($\sim 200 \times 10^3$ larvae per carboy). Larvae were sampled and the results used as reference values for physiological, biochemical, and molecular analyses ($\sim 40 \times 10^3$ larvae per sample for each kind of analysis). Larvae were cultured in duplicate with or without pathogen treatment (10^4 bacteria per mL) over a period of 24h or 48h. Larvae were fed at the beginning of the experiment and samples were collected for physiological, biochemical, and molecular analyses at the end of the experiment, as described for reference samples. Seawater from carboys was sampled for measurements of particles to estimate feeding activity and microbiological analysis. Samples were immediately flash frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C .

Larval performance

Shell length (SL), survival rate (% of live larvae based on initial number), and feeding activity (number of cleared algal cells per larva per day) were determined for each sample. Sieved larvae were transferred into 1 L buckets. Three 1 mL subsamples of larvae were removed from each bucket and the concentration of live larvae was determined

visually using a binocular microscope (Leitz Biomed, Wetzlar, Germany). SL was measured with an inverted microscope (Leitz Leica DMIL, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera. Images were captured using the Turbo TV software and analyzed by Image SXM. Microalgal cell concentration was measured in triplicate with a Beckman-Coulter Z2 electronic particle counter using a 100 μm probe (Beckman, USA) before and after experiments. Feeding activity (expressed per day) was evaluated as clearance rate = $(N_{t=0} - N_{t=\text{final}}) / \text{number of larvae per mL}$, where N is the concentration of microalgal cells per mL introduced ($t=0$) and at the end of experiment ($t=\text{final}$).

Lipid class and fatty acid analyses

Methods used to determine profiles of lipid classes and fatty acids were described in Haberkorn *et al.* [32] and Pernet *et al.* [33], respectively. Briefly, after extraction in a $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ mixture, neutral and polar lipids from samples of larvae and microalgae were extracted using silica gel micro-columns. The neutral lipids were eluted with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ and the polar lipids were recovered with CH_3OH . Neutral and polar fractions were used for lipid class determination. A preliminary run was carried out to remove possible impurities using a mixture of $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{-(C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ and $\text{CH}_3\text{COOCH}_3\text{-CH}_3\text{CH(OH)CH}_3\text{-CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-KCl}$ for the neutral and polar fractions, respectively. After plate activation, lipid samples were spotted on plates using a CAMAG automatic sampler (CAMAG, Switzerland). The lipid classes were separated with a solvent containing $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{-(C}_2\text{H}_5)_2\text{O-CH}_3\text{COOH}$. Lipid classes appeared as black spots after plates were dipped in a $\text{CuSO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ solution and heated. Plates were read by scanning at 370 nm, and black spots were quantified using Wincats software (CAMAG, Switzerland). Five neutral lipid classes (free fatty acids [FFA], alcohols [AL], mono-diacylglycerols [DG-MG], triacylglycerols [TAG], sterols [ST]) and seven polar lipid classes (cardiolipin or bisphosphatidylglycerol [Cardio], lysophosphatidylcholine [LPC], phosphatidylcholine [PC], phosphatidylethanolamine [PE], phosphatidylserine [PS], phosphatidylinositol [PI], ceramide aminoethylphosphonate [CAEP]) were identified based upon authentic standards (Sigma-Aldrich, France) and colouring techniques. Results were expressed as a percent proportion of the mass of total

lipids. Masses of neutral and polar lipids were assessed by summation of lipid classes and expressed by number of larvae. Analyses of fatty acid profiles were also performed on neutral and polar lipids. After the addition of internal standards in both fractions, the transesterified lipids (FAME) were analyzed by gas chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) using a DB-Wax (30 m × 0.25 mm; 0.25 μm film thickness) capillary column coupled with a flame ionization detector. Hydrogen was used as the carrier gas. Fatty acids were identified by comparing their retention times with those of standards using the Chem Station software (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Here again, results for fatty acid profiles were expressed as a percentage of the total fatty acid mass of each lipid fraction. The peroxidation index (PInd) was calculated as $PInd = 0.025 (\% \text{ monoenoics}) + 1 \times (\% \text{ dienoics}) + 2 \times (\% \text{ trienoics}) + 4 \times (\% \text{ tetraenoics}) + 6 \times (\% \text{ pentaenoics}) + 8 \times (\% \text{ hexaenoics})$.

Spectrophotometric analyses

Samples for spectrophotometric analysis were homogenized on ice in phosphate buffered saline (PBS: 80 mM; pH 7.6 at 25°C) with 0.1% (v/v) triton X-100 using a polytron homogenizer. A fraction of the homogenate was stored at -80°C for the determination of total glucids and protein concentrations. The remaining sample was centrifuged (15,000 g) at 4°C for 10 min and the supernatant collected and stored at -80°C. Total glucids and protein contents were measured colorimetrically as described by Dubois *et al.* [34] and Lowry *et al.* [35], respectively. The activity of seven enzymes were performed in this study. Three were related to energy metabolism (pyruvate kinase, citrate synthase, cytochrome c oxidase) and four to antioxidant defenses (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase). The oxidative stress level was evaluated by measuring the lipids peroxidation. Methods for assaying enzyme activities of citrate synthase (CS), cytochrome c oxidase (CCO), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD), and the determination of lipid peroxidation levels (TBARS) were described in Genard *et al.* [18]. Pyruvate kinase (PK) activity was assayed according to the protocol of Childress and Somero [36] adapted for microplate reader [37].

This method is based on the conversion of phosphoenolpyruvate into pyruvate, followed by the lactate-dehydrogenase (LDH)-catalyzed conversion of pyruvate into lactate and the concomitant consumption of NADH measured at 340 nm. Glutathione reductase (GR) activity was determined by measuring the absorbance increment at 412 nm when 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid; DTNB) was reduced by glutathione (GSH), generated from glutathione disulfide (GSSG) by GR according protocol of Smith *et al.* [38].

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was extracted for each larva sample using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA was resuspended in RNase-free water and concentrations were determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermofisher). One microgram of total RNA extracted from larvae was reverse transcribed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Burlington, ON, Canada). Real-time PCR was performed with 5 µL cDNA (1/120 dilution) in a total volume of 25 µL using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reaction component concentrations were 1 x Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (ABgene, Epsom, UK) and 70 nM of each primer. Reactions began with activation of the Thermo-Start DNA polymerase at 95°C for 15 min followed by amplification of the target cDNA (50 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing and extension at 60°C for 1 min), and melting curve analysis was performed with continuous fluorescence acquisition (95°C to 70°C at a temperature transition rate of 0.5°C every 10 s) to determine the amplification specificity. Each run included a negative control (non-reverse transcribed total RNA) and blank controls (water) for each primer pair. The threshold value (Ct) was determined for each gene as the number of cycles at which the fluorescence curve entered exponential phase. A sequential dilution of cDNA was performed for each set of primers in order to estimate the amplification efficiency using the equation: Efficiency = $10^{(-1/\text{slope})} - 1$. The relative quantification (RQ) of each gene expression was calculated according to the comparative CT method using the formula: $RQ = \frac{(1+E_{TG})^{(Ct_{HG}(\text{cal}) - Ct_{HG}(\text{spl}))}}{(1+E_{HG})^{(Ct_{TG}(\text{cal}) - Ct_{TG}(\text{spl}))}}$, where E_{TG} and E_{HG} are the

amplification efficiencies of the target and housekeeping (ribosomal 18S) genes, respectively, and Ct HG and Ct TG are the threshold values of the housekeeping and target genes in the calibrator (cal) or target sample (spl). Larvae sampled before the beginning of the experiment were used as reference samples (cal). Oligonucleotide primer sequences used to amplify specific gene products are shown in Table 4.1. Selected genes could be classified into four groups: energy metabolism, lipid metabolism, cellular stress, and immunity.

Table 4.1. Details of genes and primers used in the quantitative real-time PCR relative expression analysis.

Genes	Label	GENBANK	Function	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
α -agglutinin attachment subunit	AGL	CU984122	Non-self recognition (lectin family)	GCCTCCTTACACCACAGCAT	TGGTTTGCTGGATTACAGACTTC
Annexin 6	ANX6	CU989663	Apoptose, inflammation response	TCGCGCGCTGCTTTCCACGGTT	TTACCGCACCAAGAGCTACGCAGC
c-type lectin-1	eLEC	CU992287	Non-self recognition (lectin family)	ACCTGGTCCGACGCAAGA	GGGTGCTCAGAACTTGTTGATG
Defensin 2	Defh2	AJ565499	Antimicrobial peptide	ATGCCAAGCATGTTCTACAGAT	GCAAAGGATCGCTCTACCAAAGC
Cg-DRAC3	DRAC3	BQ427023	Haemocytes proliferation	TACTGTCTTCTGCTAAACGCCAC	GTCTGTGATATTGAGGTGCCAGCC
ECSIT	ECSIT	BQ427193	Immune response signalling (NF-KB)	GCCACACCATGGGATACGCCGG	TGGCACCCCGTGTCTCGTCCC
Galactin 8	Gal8	BQ427054	Non-self recognition (lectin family)	ACGGAGGTGACGGGACTT	GCTGGCACCACGATTGG
Cg-LBI/BPI	LBP/BPI	AY165040	Non-self recognition (LPS binding protein)	GGCTGGTATCCCTTGCTCCTA	CACITTAGTAGCCTCTGCATTGC
Mitogen activated protein kinase kinase 1	MAPK	CU996721	Immune response signaling	AAACTGGCAAACCCCTGAAA	CCAGGCGGACCAAGAAA
Cg-MyD88	MYD88	DQ530619	Immune response signaling (NF-KB)	GATGACGTCCCAGTCATGAGGGTGGTC	ATTCTAGATTTTTCTCCACACC
REL	REL	AY039648	Immune response signaling (NF-KB)	GTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGGAACTCTA	TTACCGCACCAAGAGCTACGCAGC
Cg-TAL	TAL	AY039650	Haemocyte proliferation	CGTGTGTGTCGGAGTGTATGTA	GCTGTGTCGGACTTCTTCA
Cg-TIMP	TIMP	AF321279	Metalloproteinase inhibitor	CAGGGTCTTACAACACGAACGA	GCTGGTTGGTTCACGGTAGA
cg-TRAF	TRAF	BQ426746	Immune response signaling (NF-KB)	GTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGGAACTCTA	ACGGAGGTTGACGGGACTT
Arachidonate 15-lipoxygenase	AA15LX	CU998478	Eicosanoid synthesis	CTCACTGCCCGCTTTCCA	GAGCGAGGAAGCGGAAGAG
Acyl-CoA synthetase	ACS	CU992135	Fatty acid oxidation	GGGACCGAGATAAAAGTAAACAAACAT	CCGCTCTGTTGGAATCA
Acyl-CoA dehydrogenase	ADH	FP001142	Fatty acid oxidation	CCGCTCAAAITCCACACAA	GCACCCAGGCTTTACACTTT
Stearoyl-desaturase 5	Delta 5	CU997931	Fatty acid desaturation	GGAGGACTCTGAGCCGAAT	GGCGAGGTGAAAGGAAGAC
Fatty acid desaturase 2	Delta 6	CU994528	Fatty acid desaturation	GAACTTTCGCCATTTTACAGAT	GGCTATATCGACATCAGGGTCTTT
Delta 9 desaturase	Delta 9	CX069227	Fatty acid desaturation	GTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGGAACTCTA	ATTCTAGATTTTTCTCCACACC
Enoyl-hydratase isomerase family protein	ECH	CU989620	Fatty acid oxidation	GCAAATTTTACAGAAATGGCATAG	GCCTCGAGAACTCAACCA
Enolase	Enolase	CU986328	Energy metabolism (glycolysis)	CCAGCCCTTCAGTCAGATGTG	GCCCATCTCTCTAACC
Adipolipin	Lipstor	CU996665	Fatty acid storage	AGAAGACCAAGGAAAGCAACCA	TGATGCTGGATTCGGCTAGA
phosphatidylcholine transferase	Petrans	CU997534	Lipids class remodelling	CCTCACACAGACGGGAAA	ACACCAGTCTAGCACCACAGTT
Phospholipase a2 receptor 1	PLA2	CU994900	Eicosanoides synthesis	CAATAACTTCAAITTCCTCCGACCAA	TTCCGAGTGTGATTTTCCATA
Phospholipase delta 1	PLD1	CU993057	Lipids class remodelling	TACTGTCTTCTGCTAAACGCCAC	GCTGGCACCACGATTGG
Phosphatidylserine decarboxylase	Psdec	CU990331	Lipids class remodelling	GGACTCTACGCTGGATGTTTCA	ATACCGTCTGCACTTACCAAAAAT
ATP synthase f0 subunit 6	AS6	FP010340	Energy metabolism (electron chain transport)	ACGGAGGTTGACGGGACTT	TGCTCAATCTCGTGTGGCTAAACGGAACTTG
Cytochrome c oxidase subunit i	CCOI	FP001743	Energy metabolism (electron chain transport)	TTCCAGTCTCAACGGTCTTTT	CGGTAAGCCAGGTTGTTTCTAT
Citrate synthase	CS-G	CG1753	Energy metabolism (acid citric cycle)	GTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGGAACTCTA	TTACCGCACCAAGAGCTACGCAGC
Glutamine Synthetase	GS	CG1753	Amino acid synthesis	GATGACGTCCCAGTCATGAGGGTGGTC	GCATTCACAGACGGTAGTCTTATGAG
Mitochondrial nadh:ubiquinone oxidoreductase	NADHox	CU999020	Energy metabolism (electron chain transport)	GATGGCAGAAAAGGATAGAATGGT	TCATCAGTCTCTCCAACTC
Catalase	CAT-G	CU996492	Antioxidant defenses	CCAGCGGACAGGAAA	TCTTATCCGCGAGTTGTA
Superoxide dismutase extracellular	ecSOD	CU999489	Antioxidant defenses	TCGCGCGTGTCTTTCCACGGTT	AAGATAGTGTCTAGGGTTCATGGC
Glutathione peroxidase 3	GPX3	CU994955	Antioxidant defenses	CCGTTGCTCCCTCGCTTT	AAGATGGCGGTGATTGC
Glutathione peroxidase 5	GPX5	CU988021	Antioxidant defenses	CGTTCCGCGCGGTAGTG	GCGGTGACATCGCCTATTC
Glutathione reductase	GR-G	FP000015	Antioxidant defenses	GCCACCAAGGCCAGTT	AGATTTCCGCGGAGTGTA
Heat Shock protein 70	HSP70	CX069205	Cytoprotection	GCCACACCATGGGATACGCCGG	TGCTCAATCTCGTGTGGCTAAACGGAACTTG
Metallothionein	MT	CU998632	Cytoprotection	GAGGAGAAACATCAAGACTAAGAAAAACA	ACACCAATCAGAGCAGACATG
Peroxiredoxin 2	PRDX2	FP005009	Antioxidant defenses	CCTAAGCCATCACCTACACAA	CAACACTGAAAAACAAAAGCTGAAC
Peroxiredoxin 4	PRDX4	FP005664	Antioxidant defenses	CAGGGCTGCTGATGATGACA	GGTGAGGCTTGGAAATGA
Peroxiredoxin 5	PRDX5	CU986700	Antioxidant defenses	GCTGTGGATTTGTTGAGAAGGAT	TGAGCAACAGGAGTGAAAGC
Peroxiredoxin 6	PRDX6	CU984218	Antioxidant defenses	ACTCCATACCCCATCATTTCC	GGATCAACCTATGCCAGTTT
Permin	PRN	CD526735	Cytoprotection	GTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGGAACTCTA	GCTGGCACCACGATTGG
Superoxide dismutase	SOD-G	FP005332	Antioxidant defenses	ATGCCAAGCATGTTCTACAGAT	CACITTAGTAGCCTTGCATTGC

Microbiological analyses

RT PCR-DGGE

The bacterial environment was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) followed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) performed on reverse transcribed (RT) RNA, resulting in a fingerprint of active bacteria. In general, analyses targeting rRNA are expected to be more responsive because metabolically active cells contain a higher level of intracellular 16S rRNA than do quiescent cells. The RNA from water, food, *V. corallilyticus*, and larvae was extracted then reverse transcribed according to protocols described above in the section *RNA extraction and real-time PCR*. PCR was performed on formed cDNA using 16S rDNA gene primer sets (341f-GC: 5'-GC-clamp-CCTTACGGGAGGCAGCA-3' and 518r: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). The reaction mixture contained 20 ng of cDNA, 1 μ M of each primer, 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, and 1 U AmpliTaq DNA polymerase (Invitrogen) with 1X of its buffer in milliQ water for a final volume of 25 μ l. PCR cycling was carried out in a thermocycler (My Cycler™ thermal cycler, Biorad, USA) using the touch-down program as described elsewhere with slight modifications, i.e., initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 10 cycles with denaturation at 94°C for 30s, and touchdown annealing from 65°C to 56°C for 30 s. The annealing temperature decreased 1°C for each cycle. The annealing temperature was set at 55°C for the 20 cycles and primer extension was performed at 72°C for 30s. The final extension was run at 72°C for 30 min to decrease the non-specific amplification prior to cooling at 4°C. PCR products were loaded onto 8% (w/v) polyacrylamide gel (acryl/bis acrylamide 37:5:1 Biorad) cast in 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1mM EDTA, pH 8.0). The polyacrylamide gels were made with a denaturing gradient ranging from 40 to 80% for eubacterial primers (100% denaturing, containing 7 M urea and 40% deionized formamide). DGGE was carried out with the D-code DGGE system (Bio-Rad Laboratories, France). Electrophoresis was conducted in 1 x TAE buffer at a constant voltage of 80 V and a temperature of 60°C for 18 h. After electrophoresis, gels were stained with SYBR-gold diluted at 1/10000 for 30 min and rinsed with 0.5x TAE for 15 min. Fluorescence was revealed at 540 nm using a fluorimager.

(typhoon 9400, Amersham) and the images obtained were analyzed. The number of bands, corresponding to different operational taxonomic units (OTU), was determined visually for each sample. A similarity matrix using Jaccard's distance index (S_{jaccard}) was used to compare the fingerprints.

The Jaccard index was calculated as $S_{\text{jaccard}} = N_{\text{AB}} / (N_{\text{A}} + N_{\text{B}} - N_{\text{AB}})$, where N_{AB} is the number of similar bands between samples A and B; $N_{\text{A or B}}$ is the sum of all bands in sample A or B. Specific DGGE bands chosen by comparison with bacterial controls were excised from gels in order to detect *V. corallilyticus* during the experiment. Bands were reamplified and the presence of an individual band was verified by a second DGGE electrophoresis. The bands were excised from the second gel and the fragment of the variable V3 region of the eubacterial 16S rRNA gene was amplified with 341f without the GC-clamp and 518r. The amplified products were then cloned into PCR II plasmids using the TA cloning kit and transformed into *Escherichia coli* DH5 α (Fisher Scientific SA, France) according to the manufacturer's instructions. Four positive clones were randomly chosen per band for sequencing. The sequencing was done using the SP6 promoter primer and the 16 capillary ABI3130 XL sequencer. Sequences were analyzed using the Bioedit software and then compared to the GenBank database using the online software and the Basic Local Alignment Search Tool algorithm (BLAST).

Flow cytometry

To complete DGGE results, the total bacterial load was investigated by flow cytometry. To do this, 10 mL of seawater were removed from each carboy and 1% glutaraldehyde was added for sample conservation. Frozen water samples were quickly thawed in a 30°C water bath and were stained with SYBR Green I (Invitrogen). Bacteria were counted with an Epics Altra flow cytometer (Beckman Coulter) fitted with a 488 nm laser operated at 15 mW. The green fluorescence of nucleic-acid-bound SYBR Green I was measured at 525 ± 5 nm. The analyzed sample volume was determined from the change in mass corrected for a dead volume of 50 μL (the water volume taken from the sample tube

but not yet counted when data acquisition is stopped). The cytograms obtained were analyzed using Expo32 v1.2b software (Beckman Coulter).

Statistical analyses

Analyses for larval performance (growth, survival, feeding activity) were carried out using the SAS® Software system (8.2). The significance value for all analyses was set at $p < 0.05$. PROC GLM (two-way ANOVA) was used to estimate the effect of bacterial challenge, experiment time, and their interaction. Where differences were detected, LSMEANS (t-test) multiple comparisons tests were used to determine which means were significantly different. Residuals were graphically assessed for normality using the PROC PLOT function coupled with the univariate procedure (PROC UNIVARIATE). Homogeneity was tested using the O'Brien test.

A canonical redundancy analysis (RDA) was performed as a form of MANOVA, as proposed by Legendre and Anderson [39]. This method allows an estimation of the fraction of variation in 116 response variables (biochemical, physiological, and molecular parameters) attributable to the explanatory variables (time, bacterial challenge, and their interaction). This method, which is valid for small samples and non-normally distributed data, can be described as a series of multiple regressions followed by a principal component analysis where each response variable, Y , is regressed on the matrix corresponding to the explanatory variables, X [40]. More precisely, matrices for challenge and time effects were coded using orthogonal dummy variables, and the interaction matrix was obtained by computing the product of the dummy variables representing the challenge and time effects. Each explanatory variable was individually tested with the others as covariables (matrix Y) to remove the variance explained by these other factors. An overall test of significance of the canonical relationship (999 permutations) and an ordination biplot (Z-plot type) were generated from the RDA results [40]. The biplot displays correlations between the response and explanatory variables.

The functions `rdaTest` and `plot.rdaTest`, written in the R language by P. Legendre and S. Durand, were used for our analyses (<http://www.bio.umontreal.ca/legendre/indexEn.html>). A posteriori comparison tests (LSMEANS, 8.2 SAS® software) were used to estimate the significance of differences observed in RDA.

Results

Larval performance

Mortality rate was directly affected by bacterial challenge and increased with time. It was 2.5-fold higher in challenged larvae and 1.4-fold higher after 48h (Figure 4.1). Significant interactions between time and bacterial challenge were found for feeding activity (clearance rate). Feeding activity decreased significantly after 48h of pathogen exposure to reach a value 67% lower than observed in unchallenged larvae (Fig. 1). Concerning growth, no changes were noted in shell length after bacterial challenge and during the experiment (p -value: challenge = 0.407, time = 0.066, interaction = 0.731).

Bacterial community analysis

Two bands were excised from DGGE gels used for *Vibrio corallilyticus* detection; the BLAST treatment confirmed that the corresponding sequences were highly similar to *V. corallilyticus* ribosomal 16s (see electronic supplementary material S1 for DGGE gels, BLAST results, and sequence alignment). In seawater tanks used for challenge, *V. corallilyticus* was detected as early as 24h after the challenge began. Our analysis of the Jaccard index matrix showed duplicate similarities greater than 90%. Furthermore, other than the presence/absence of bands associated with *V. corallilyticus*, high similarity (above 75%) was found between the OTU profiles of challenged and unchallenged larvae at 24h and 48h. These results showed that pathogen inoculation induced few changes in the active bacteria environment throughout the experiment. Flow cytometry analyses revealed a significant decline in the bacterial load after 48h independently of bacterial challenge

(Figure 4.2). This decline seemed to be shown in the DGGE gel, as reflected by the low OTU similarity (below 50%) between 24h and 48h and the low band intensities after 48h.

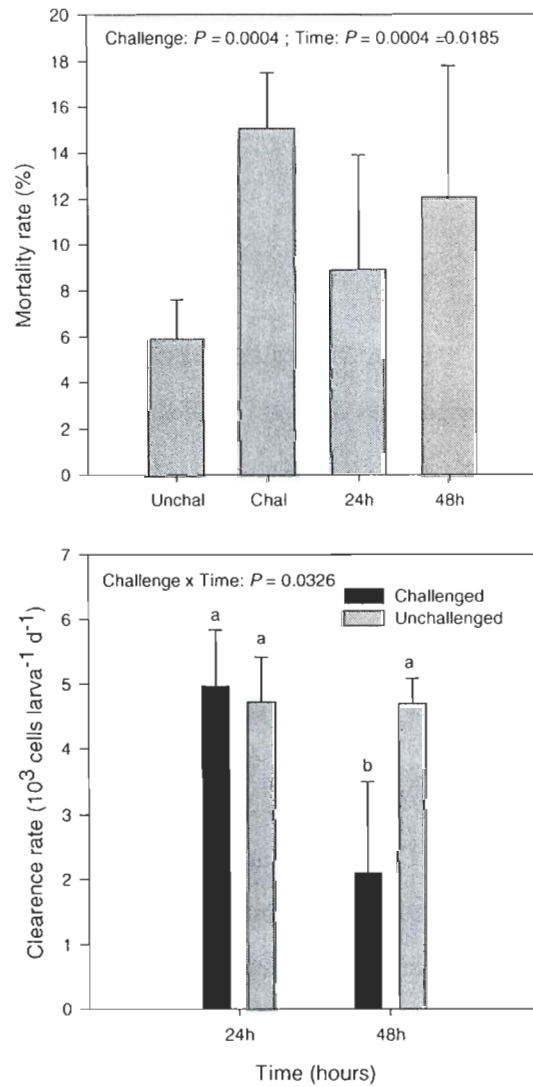


Figure 4.1. Mortality and clearance rate for Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae as a function of experiment duration and bacterial challenge. Larvae were stimulated with *Vibrio corallilyticus* for a period of 24h or 48h. Data from different treatments were pooled when this effect was not significant. Chal: challenged larvae; Unchal: unchallenged larvae. Data are means \pm SD of duplicate tanks. Different letters indicate significant differences.

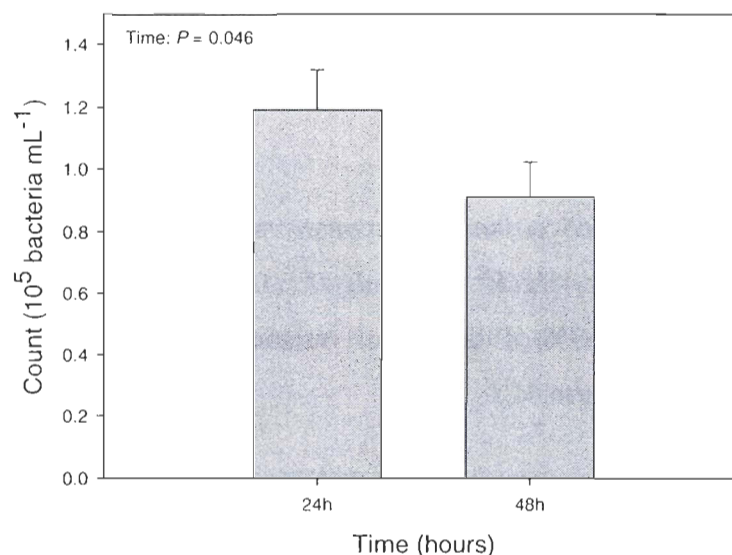


Figure 4.2. Significant temporal changes of the bacterial load in carboys independently of bacterial challenge.

Redundancy analysis

The first set of RDA analyses was performed on the whole data set (116 response variables). The overall variance was explained by time and challenge and their interaction (challenge: R^2 : 0.26, F : 3.79, p : 0.03; time: R^2 : 0.26, F : 4.22, p : 0.026; interaction: R^2 : 0.19, F : 2.80, p : 0.031). The significant interaction effect led us to test the effect of each factor separately in each class of the other factor. For this, a second set of RDA analyses was performed to estimate the challenge effect at each time and the time effect in challenged and unchallenged larvae. Four explanatory variables were built: “Chal24” and “Chal48” for the challenge effect at 24h and 48h, respectively, and “Time Chal” and “Time Unchal” for the time effect in challenged and unchallenged larvae. RDA results were regrouped in two biplots, one illustrating the challenge effect (Chal24 and Chal48) and a second showing temporal change (Time Chal and Time Unchal). Due to the high number of response variables, only those showing a significant difference for challenge and/or time effect in multiple comparisons tests were included in the corresponding biplots; non-essential fatty acid were also excluded. Mean, standard deviation, variance explained by the RDA model,

and multiple comparisons results for each response variable are summarized in the electronic supplementary materials (S2).

Challenge effect

RDA analyses performed on the 52 response variables that showed a significant effect of challenge at 24 and/or 48h (R^2 : 0.62, *adj. R*²: 0.48, *F*: 4.22, *p*: 0.01) indicated that pathogen exposure explained 63% of the overall variance of these selected variables. The resulting biplot is shown in Figure 4.3.

The impact of *V. corallilyticus* on energy metabolism in larvae could be seen by the lower relative expression of three genes related to energy production (CCOi, AS6, NADHOX) and by the lower activities of cytochrome c oxidase (CCO-A) and pyruvate kinase (PK-A). Apart from effects related to energy metabolism, bacterial challenge induced changes in lipid composition. After 48h, challenged larvae had lower neutral lipid contents and exhibited lower proportions of triglycerides (TAG) and lysophosphatidylecoline (LPC); phosphatidylinositol (PI) was the only lipid class that was always higher in challenged larvae. Interestingly, the lower neutral lipid content coincided with the down-expression of “Lipstor”, a gene involved in lipid storage. Neutral lipids from challenged larvae after 48h were characterized by a higher peroxidation index (N-PI_{nd}) and higher proportions of polyunsaturated fatty acids (N- Σ PUFA), free fatty acids (FFA), and 20:5(n-3) (N-EPA). After 48h of pathogen exposure, the polar fraction showed a lower peroxidation index (P-PI_{nd}); lower proportions of polyunsaturated fatty acids (P- Σ PUFA), 20:4(n-6) (P-AA), 22:6(n-3) (P-DHA), and 22:5(n-6) (P-DPA); and higher amounts of monounsaturated fatty acids (P- Σ MUFA). Challenged larvae also showed higher a proportion of non-methylene-interrupted fatty acids in the polar lipids (P- Σ NMI). These changes in fatty acid composition were reflected at the molecular level by the over-expression of genes associated with lipid metabolism in larvae challenged for 24h for ACS and ECH, and after 48h for PLA2, PLD1, AA15LX, ACDH, Delta5, and Delta6. Pathogen exposure induced the activation of antioxidant defenses; this was revealed by the higher

transcript abundance of antioxidant enzymes measured after 24h of exposure for GPX5 and after 48h for GR-G, SOD-G, CAT-G, PRDX4, and PRDX5. This over-expression of catalase (CAT-G) and superoxide dismutase (SOD-G) in challenged larvae was reflected at the physiological level by higher activities of the corresponding enzymes (CAT-A, SOD-A). We found higher gene expression of proteins associated with cellular stress (HSP70, PRN) simultaneous to the activation of antioxidant defenses. Finally, immune response activation was observed 24h after bacterial stimulation by the over-expression of four genes related to the immune reaction (MYD88, cLEC, DRAC3, LBP/BPI) followed at 48h by the activation of six others (Defh2, TIMP, TAL, TRAF, REL, AGL).

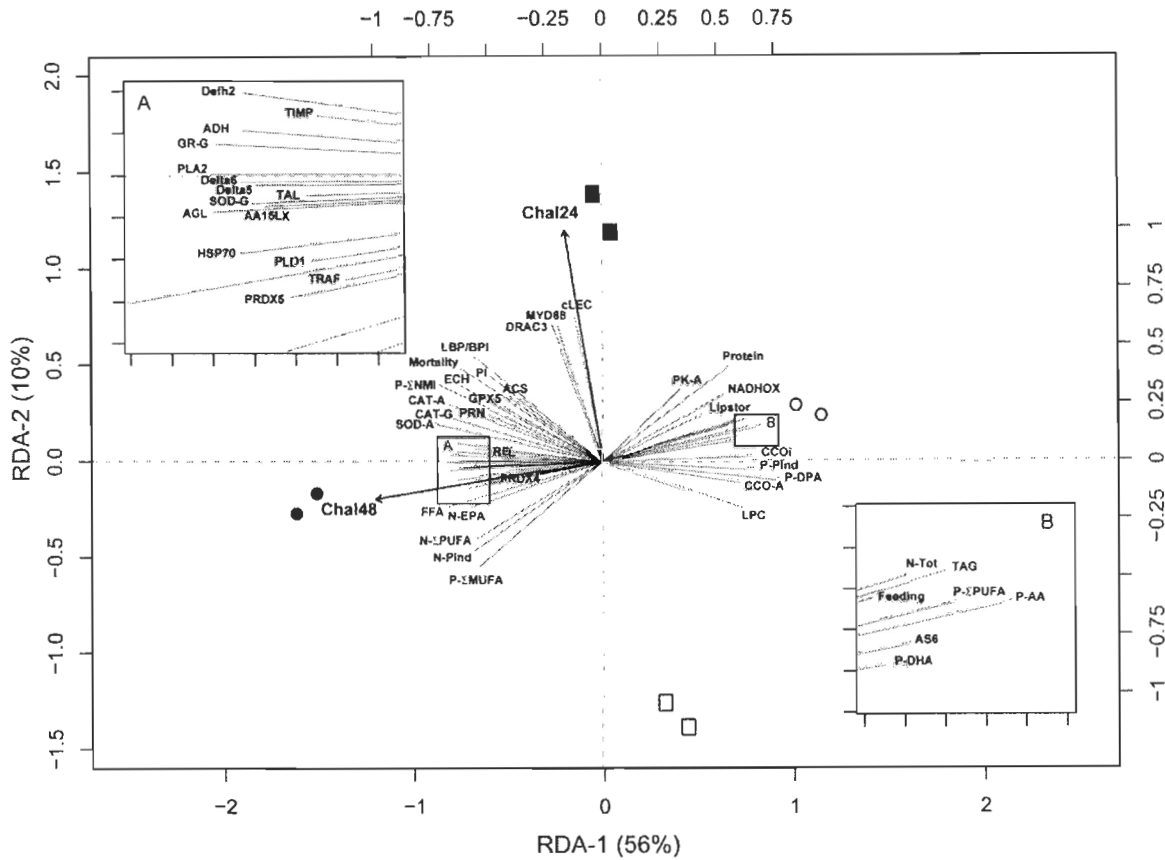


Figure 4.3. RDA ordination biplot representing the significant ($p < 0.05$) challenge effect after 24 (Chal24) and 48h (Chal48) as explanatory variables (arrows) on selected response variables (lines) related to energy metabolism, lipids, cellular stress, and immunity. Only the response variables where significant effects were found in multiple comparisons tests were selected. Black symbols: challenged larvae, white symbols: unchallenged larvae, squares: 24h of exposure, circles: 48h of exposure. See Table 4.1 for abbreviations of response variables.

Temporal changes

We selected 57 response variables for the RDA test evaluating temporal changes in challenged and unchallenged oyster larvae. The test explained 62% of the overall variance of these variables ($R^2: 0.62$, $adj R^2: 0.46$, $F: 4.01$, $p: 0.012$). Several trends were identified in the biplot (Figure 4.4). In challenged larvae, we observed an increase in transcript abundance after 48h for genes involved in antioxidant defenses and cellular stress (GR-G,

SOD-G, CAT-G, PRDX5, HSP70), in lipid metabolism (PLA2, PLD1, AA15LX, ADH, Delta5, Delta6), and in immunity (AGL, Defh2, TAL, TIMP, TRAF, REL). In addition to these molecular changes, we found increases in catalase activity (CAT-A), in the three neutral lipid components (FFA, N-EPA, N-DHA), and in the peroxidation index in neutral lipids (N-Pind). After 48h of pathogen exposure, we observed a decline in neutral lipid (N-Tot) content, in the proportion of triglycerides (TAG), and in the relative expression of three genes related to immunity (MYD88, DRAC3, cLEC). Concerning the unchallenged larvae, 15 response variables were found to increase with time. These variables were linked to energy metabolism (protein, CCO-A, PK-A, AS6, NADHOX, CCOi), to lipid composition (P-PInd, P-EPA, P-AA, P-DPA, P-DHA, P- Σ PUFA, LPC, Lipstor), and to antioxidant defenses (GR-A). We simultaneously measured a decline in five lipid components (DG-MG, N-AA, N- Σ PUFA, N-Pind, P- Σ MUFA) in the same larvae. The remaining response variables increased with time independently of the bacterial challenge. These variables including the mortality rate (mortality) were related to lipid peroxidation levels (TBARS), to antioxidant peroxidases (GPX5, PRDX4, PRDX6, GPX-A), to polar lipid contents (P-Tot), and to the expression levels of four genes (CS-G, PRN, ACS, ANX6).

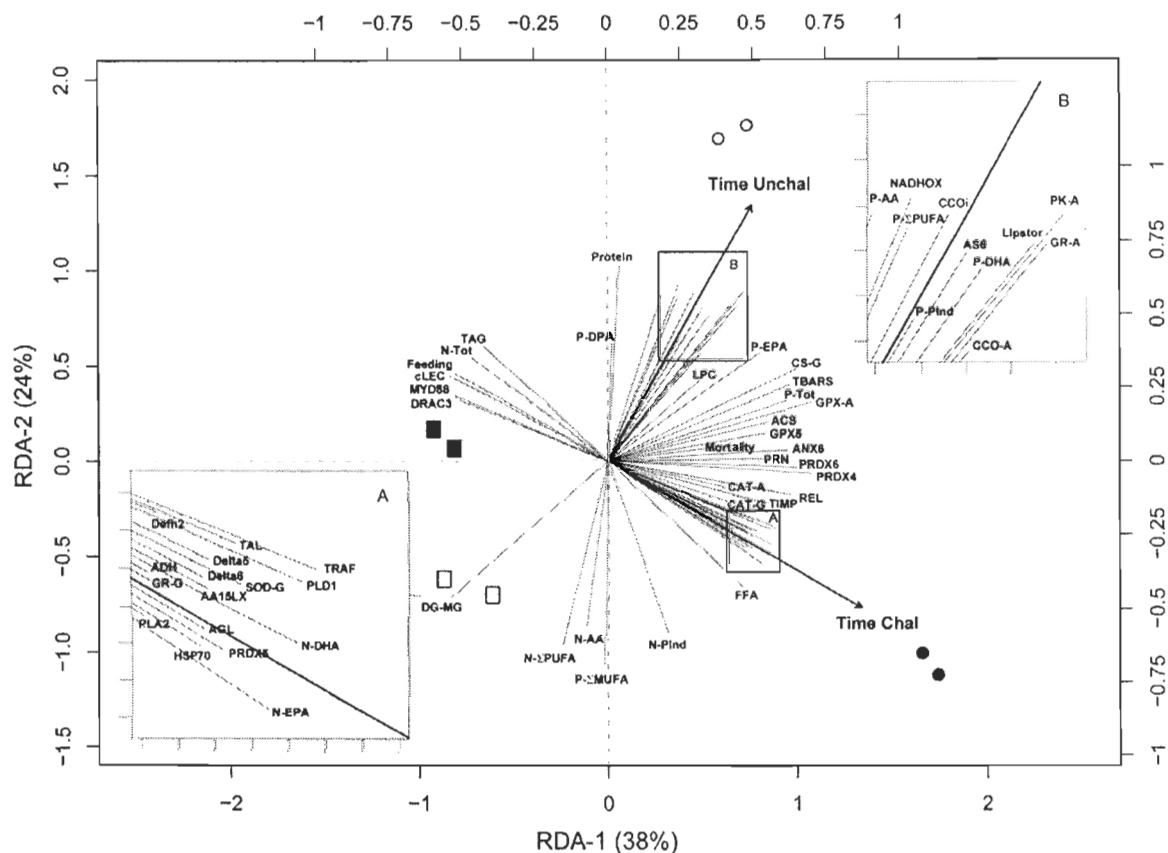


Figure 4.4. RDA ordination biplot representing the significant ($p < 0.05$) experimental time effect on challenged (Time Chal) and unchallenged (Time Unchal) larvae as explanatory variables (arrows) on selected response variables (lines) related to energy metabolism, lipids, cellular stress, and immunity. Only the response variables where significant effects were found in multiple comparisons tests were selected. Black symbols: challenged larvae, white symbols: unchallenged larvae, squares: 24h of exposure, circles: 48h of exposure. See Table 4.1 for abbreviations of response variables.

Discussion

Bacterial challenge

V. coralliilyticus, which was first described as a pathogen of coral, has been isolated from diseased oyster larvae in the United Kingdom [41-42] and France (J-L Nicolas, IFREMER personal communication). This bacteria was recently used for a challenge experiment with the green mussel *Perna canaliculus* [43]. In this study, mortality rates were 13% and 17% in challenged larvae compared to 5% and 7% in unchallenged larvae after exposures of 24h and 48h, respectively. These results showed that an inoculation with 10^4 bacteria per mL induced significant increases in mortality rate but did not lead to a septicaemia response or massive mortality in opposite with previous challenge in which an inoculum of 10^4 induced in 48H large mortality (>50%). The sequencing of RT PCR-DGGE bands revealed the presence of 16S cDNA from *V. coralliilyticus* in the larval culture water after 24h of challenge, confirming that *V. coralliilyticus* was metabolically active at this time. After 48h of challenge its disappearance could be due to the detection limit of the PCR-DGGE technique. The flow cytometry analysis showed that the bacterial load declined during the experiment, suggesting that *V. coralliilyticus* concentration could drop below the detection limit after 48h. The reason for the bacterial load decline could be explained by an increase in bacterial mortality due to the grazing activity of larvae, as demonstrated by Douillet [44] and the activation of immune defenses in the remaining alive larvae which neutralized it. Finally, our analysis of the similarity index based on OTU from PCR-DGGE demonstrated that not including the presence or absence of *V. coralliilyticus*, the composition of the remaining active bacteria surrounding and those associated with larvae was similar independently of pathogen stimulation. All of these elements illustrate that the utilization of *V. coralliilyticus* for pathogen stimulation in *C. gigas* was carried out under appropriate conditions.

Energy metabolism

Eight parameters were investigated to monitor energy metabolism, including the activities of pyruvate kinase (PK-A), citrate synthase (CS-A), and cytochrome c oxidase (CCO-A), which are involved in glycolysis, the acid citric cycle, and the respiratory chain complex, respectively. In addition to these enzymes, the gene expressions of enolase (Enolase, glycolysis), citrate synthase (CS-G, citric cycle), cytochrome c subunit i (CCOi, respiratory chain complex IV), NADH ubiquinone:oxidoreductase (NADHox, respiratory chain complex I), and ATP synthase subunit 6 (AS6, respiratory chain complex V) were investigated. Except for the expression of enolase and the activity of citrate synthase, all of these parameters increased after 48h in unchallenged larvae. The increase in energetic abilities during premetamorphic development has been demonstrated in oysters [18, 45-47] and discussed in sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* larvae by Meyer *et al.* [48]. The latter noted that increased energy metabolism during larval development was associated with increases in metabolic rate and oxygen consumption to sustain growth (allometric relationship). This pattern of energy metabolism differed when larvae were challenged by *V. coralliilyticus*. Indeed, we observed that enzymes related to energy (PK-A, CCO-A, CCOi, NADHox, AS6) remained constant during the experiment, explaining the lower values measured 48h after bacterial challenge compared to unchallenged larvae. This suggests that, contrary to the condition found with unchallenged larvae, energy metabolism was maintained at the same level when larvae were stimulated with *V. coralliilyticus*. This trend to maintain a basal metabolic ability has already been observed in *C. gigas* larvae when food is limited [46, 45]. Interestingly, the feeding activity in challenged larvae declined after 48h of exposure, as has been observed during disease events in bivalves [19, 18, 20]. The process involved in the decrease of larval feeding during pathogen exposure was not clearly understood, but it was demonstrated that many bacteria could release potent toxins that reduce feeding activity in *C. gigas* larvae [49]. After pathogen stimulation, feeding declines and the metabolic rate of larvae decreases, as was suggested in Manila clams infected by brown ring disease [21] and in *C. virginica* larvae submitted to a massive mortality event [18]. The decline of food intake coincided with lower triglyceride and

protein content, the two main energetic reserves in bivalve larvae. The impact of feeding level on energy reserves has been studied in Pacific oyster larvae [46, 45]. In these studies, it was hypothesized that challenged larvae compensate for the decline in feeding activity by metabolizing TAG and protein. The higher concentrations of free fatty acids (FFA) in challenged larvae after 48h seem to confirm TAG catabolism. Indeed, FFA usually result from TAG degradation by lipase [50]. Moreover, Sewell [51] found that starved sea urchin (*Evechinus chloroticus*) larvae have an early peak in FFA when TAG had been consumed. TAG catabolism could also be suggested by the over-expression of acyl-CoA synthetase (ACS), acyl-CoA dehydrogenase (ACDH), and enoyl-CoA hydratase (ECH), three key enzymes of β -oxidation. The fatty acids stored in TAG are broken down sequentially through β -oxidation to yield acetyl-CoA, which can then be fed into the Krebs cycle to produce energy [52-53]. β -oxidation has been little studied in marine invertebrates [54]; to our knowledge, our study is the first to identify the activation of this metabolic ways in challenged bivalve larvae. Beside the β -oxidation activation, the lower ability for challenged larvae to accumulate lipids could be seen by the down-expression of adipophilin (Lipstor), a protein involved in lipid droplet formation and triglyceride accumulation [55].

Structural lipids

Except for lysophosphatidylcholine (LPC) and phosphatidylinositol (PI), the proportions of major sterol and the phospholipid classes did not change during bacterial challenge. Challenged larvae exhibited lower LPC and higher PI content. These results are hard to explain, and to our knowledge, the evolution of phospholipid classes in larval *C. gigas* and after pathogen exposure is unknown. Nevertheless, the absence of changes in phosphatidserine (PS) and phosphatidylcholine (PC) proportions was reflected at the molecular level by the unchanging expressions of the two genes involved in PS and PC remodelling: PS decarboxylase (PSdecar) and PC transferase (PCtrans), respectively. The higher PI and lower LPC content in challenged larvae could be linked to the utilization of derivatives in immune response signalling. Indeed, it has been demonstrated that phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI3) generated by phosphatidylinositol-3 kinase

(PI3K) is a crucial signal transducing elements that regulate communication across the plasma membrane, especially during the immune response [56-57]. Although this pathway was proposed to have an potential role in the signalling of immune response in molluscs [58-59], the effect on PI content has never been demonstrated and would necessitate further investigation. Many studies in vertebrates have revealed that LPC could play an important part in immune response transduction. Indeed, LPC activates several second messengers in vertebrates, including extracellular signal-regulated kinases, mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide-3-kinase, Ca^{2+} , adenylate cyclase (AC), Rho protein, and platelet-activating factor (PAF), all of which are known to regulate the inflammatory response [60-62]. However, the occurrence of these immune signalling processes is largely unknown in marine invertebrates and needs further investigation.

Concerning fatty acids, changes in polar lipid composition were observed in challenged larvae. Unlike unchallenged larvae, challenged larvae did not accumulate major C_{20} PUFA (DHA, DPA, AA) after 48h, as is usually observed during development of bivalve larvae [63-64]. Moreover, the level of the naturally biosynthesized NMI fatty acid (essentially 22:2 NMI) was always higher in challenged larvae. All of these elements seem to indicate that challenged larvae, probably because their lower feeding activity, were unable to extract sufficient essential fatty acids from their diet and compensated for this lack in major PUFA by accumulating NMI fatty acids. Indeed, an increase in 22:2 NMI may compensate for the decrease in other long-chain PUFA such as DHA [65]. Moreover, a higher NMI content in cell membranes could compensate for the decrease in the peroxidation index attributed to oxidative stress that may occur during infection. This hypothesis is supported by the fact that NMI fatty acids are more resistant to oxidation than are other PUFA [66]. It was also suggested that since NMI fatty acids usually occur in the outer membrane of mollusks, their presence may increase resistance to attack by microbial lipases [67].

Fatty acid remodelling after pathogen stimulation was also suggested by the activation of two genes coding for fatty acid desaturases, Delta5 and 6. The physiological

role of delta 5 desaturase in marine invertebrates has not been extensively studied. Nevertheless, studies have demonstrated that Delta5 plays an important role in the biosynthesis of NMI fatty acids [65, 68]. The pathways consist of delta9-desaturation and the elongation of 16:0 and 18:0, respectively, into 20:1 ω 7 and 20:1 ω 9. Thereafter, a delta5 desaturation converts them, respectively, into 5,13-20:2 and 5,11-20:2 (20:2 NMI_{i and j}), and these are finally elongated into 7,15-22:2 and 7,13-22:2 (22:2 NMI_{i and j}), respectively. The delta 6 and delta 5 desaturases govern the rate-limiting steps in the biosynthesis of long-chain PUFAs. The biosynthesis of long-chain PUFAs from 18-carbon precursors of the n-6 and n-3 series involves successive desaturation and elongation steps. The first step is the delta 6 desaturation of 18:2(n-6) (LA) and 18:3(n-3) (ALA). After an elongation step, 20:4(n-6) (AA) and 20:5(n-3) (EPA) are formed by delta 5 desaturation. The final step is a complex pathway whereby EPA is chain-elongated to 22:5(n-3) and then to 24:5(n-3). The latter is then converted by a delta 6 desaturase to 24:6(n-3), which is finally chain-shortened by peroxisomal β -oxidation to 22:6(n-3) (DHA) [69-70]. Although it is well demonstrated in fish species [71-72], the occurrence of delta 6 desaturase and the ability to synthesize long chain PUFAs *de novo* have not been clearly demonstrated in bivalves [65]. However, Nevejean *et al.* [73] suggested a possible conversion of EPA into DHA by elongation, delta 6 desaturation, and β -oxidation when no food source of DHA was presented to scallop larvae. Moreover, Laing *et al.* [74] suggested that EPA was utilized by the Manila clams to produce DHA to enable the larvae to maintain the levels found at metamorphosis, and Stewart *et al.* [54] proved the existence of a peroxisomal system whereby long-chain fatty acids are shortened through extra mitochondrial β -oxidation in the hepatopancreas of scallop (*P. magellanicus*). Interestingly, the activation of Delta6 coincided with a decrease of LA and ALA in polar lipids (see electronic supplementary material S2 for data), with a slight increase in EPA and DHA in neutral lipids and with the activation of three genes related to β -oxidation, suggesting limited PUFA interconversion ability in this study.

The activation of desaturases coincided with the over-expression of three other genes involved in lipid metabolism, AA15LX, PLA2, and PLD1. Phospholipase A2 (PLA2) has been implicated in diverse cellular processes, but perhaps the most notable function of PLA2 is its ability to initiate the inflammatory response. Following its production by PLA2, AA (or EPA) is metabolized through the cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LX) pathways to yield prostaglandins and leukotrienes, respectively. As oxygenated metabolites, these eicosanoids promote inflammation through the recruitment of granulocytes such as neutrophils to the site of injury or infection [75]. AA15 lipoxygenase (AA15LX) was directly involved in the leukotrien transformation of AA to 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) [76-77]. Activation of the eicosanoid pathway through phospholipase and lipoxygenase activation during the immune response have been well demonstrated in insects [78-79], but few references concerning eicosanoid production in bivalves exist [80-83]. However, Delaporte *et al.* [84] found that diets supplemented with AA increased haemocyte count, phagocytosis, and the production of reactive oxygen species (ROS) by haemocytes in *C. gigas*, and suggested that AA—directly or via its eicosanoid metabolites—affects oyster haemocyte functions. Phospholipase D1 (PLD1) is a widely distributed enzyme found in bacteria, fungi, plants, and animals. It has been implicated in several important cellular functions and in mammals is under the control of many hormones, neurotransmitters, growth factors, and cytokines. Its principal substrate is PC and its product is phosphatidic acid (PA); it is widely believed to have a signalling role [85]. Moreover, PLD1 has been associated with the activation of monocytes/macrophages, neutrophils, and mast cells [86]. Interestingly, the signalling pathway associated with PLD1 implicates LPC, PC, PA and PLA2. Indeed, lysophosphatidic acid (LPA), an central second messenger of this pathway, may be synthesized from LPC produced by the PLA2 transformation of phosphatidylcholine (PC), or by the PLA2-catalyzed deacylation of PA generated by PLD1 [62]. Concerning the lower LPC content and the activation of both these phospholipases in challenged larvae, we can hypothesize an activation of LPA synthesis after pathogen stimulation.

Cellular stress

Challenged larvae showed higher activities of catalase (CAT-A) and superoxide dismutase (SOD-A), two key enzymes involved in antioxidant defenses, suggesting their activation after pathogen stimulation. This activation was also reflected at the molecular level by the over-expression of the genes GPX5, GR-G, CAT-G, SOD-G, PRDX-4, and PRDX-5 related to glutathione peroxidase (family 5), glutathione reductase, catalase, superoxide dismutase, and peroxiredoxin (family 4 and 5), respectively. The activation of antioxidant defenses could be explained by the generation of various free radicals (ROS) during intracellular destruction of phagocytized bacterial material in a manner resembling the respiratory burst of vertebrate phagocytes, as observed in the scallops *Patinopecten yessoensis* and *Pecten maximus*, the oysters *Crassostrea virginica*, *C. gigas*, and *Ostrea edulis* [87], the mussels *M. edulis* and *M. galloprovincialis* [88], and the clam *Mercenaria mercenaria* [89]. ROS generation is controlled by an antioxidant defense system involving enzymes like catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin to limit tissue peroxidation. In the shrimp *Litopenaeus vannamei* and in the abalone *Haliotis discus discus*, the expression of glutathione peroxidase is significantly up-regulated 12 h after *Vibrio alginolyticus* challenge and returns to normal by 24 h [90-91]. The expression of superoxide dismutase takes 48 h for up-regulation in the gastropod snail *Biomphalaria glabrata* when challenged with the parasite *Echinostoma caproni* [92]. Higher activities of catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase were observed in *C. virginica* larvae when massive mortality occurred after degradation of the bacterial environment [18]. To our knowledge, our study clearly demonstrates the direct involvement of antioxidant defenses in bivalve larvae during bacterial challenge for the first time.

The lack of PRDX6 and ecSOD responses to pathogen stimulation has been already observed in Sydney rock oyster [93]. The authors of this study suggest that both these genes may not be inducible after pathogen stimulation in this species. This hypothesis was confirmed for ecSOD in *C. gigas* larvae before the metamorphosis [10]. However, peroxiredoxin 6 (PRDX6) has been found to be up-regulated in marine invertebrates in

response to increased H_2O_2 concentrations in tissues from oxidative burst [90-91] and following a mortality event in *C. virginica* larvae [47]. Moreover, our results showed that PRDX6 expression increased with time independently of bacterial challenge following the increase of lipid peroxidation levels (TBARS). The correlation between PRDX6 expression and lipid peroxidation has been observed in *C. virginica* larvae [47] and could be explained by the ability of PRDX6 to repair peroxidized lipids in cell membranes [94]. Parallel to the increase in lipid peroxidation, we also measured increases in glutathione peroxidase activities (GPX-A) and in the expressions of GPX5 and PRDX4, suggesting an increase in oxidative stress followed by the activation of peroxidase during *C. gigas* larval development; this has also been observed in *C. virginica* [18, 47]. The latter suggest that antioxidant defenses adapt to the increased ROS levels as energy metabolism improves during larval development (allometric relationship); this was suggested for the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* [95]. Studies on ROS generation during respiration have shown that a significant amount of the oxygen consumed can be transformed into ROS [96-97]. The increase in energy-related parameters in unchallenged larvae supports this hypothesis and explains the increase in lipid peroxidation during ontogeny. Nevertheless, it could not explain the increase in lipid peroxidation in challenged larvae, where no change was observed in energy metabolism. This implies another origin for oxidative stress damage, and the most probable is the ROS produced during the immune response.

After 48h of bacterial challenge, we observed a higher relative expression of the HSP70 gene. Heat shock proteins (HSP) are stress-response proteins implicated in cytoprotection that act as molecular chaperones, preventing premature folding of proteins and aiding in the translocation to organelles. Under stress conditions, HSP are believed to bind to damaged or misfolded polypeptides, either facilitating their repair or targeting irreparably damaged proteins for degradation [98-100]. HSP70-mediated cytoprotective effects have been observed in pathological conditions in aquatic organisms. Increased HSP70 levels in various tissues were observed in fish species exposed to bacterial pathogens [101-102]. In *C. virginica*, studies showed that the expression of HSP70 increased in haemocytes with increasing intensities of *Perkinsus* infection [103] and after

massive mortality events of larval stages [47]; similar observations were made for HSP70 RNA transcripts in the haemocytes of scallops infected by *Vibrio anguillarum* [104]. Like HSP70, another gene coding for a cytoprotective-related protein, pernin (PRN), was over-expressed in challenged larvae. PRN, also called cavortin, is a non-pigmented, glycosylated protein known to participate in the binding of divalent metal cations, principally Fe, suggesting that PRN functions as an iron chelator or chaperone. In addition, PRN acts as a serine protease inhibitor and has sequences clearly homologous to the active-site domain of Cu–Zn SODs (superoxide dismutases) [105]. PRN has the capacity to inhibit in vitro *P. marinus* growth [106]. Tanguy *et al.* [107] identified a gene coding for a PRN among *C. virginica* haemocytes and observed an increase of mRNA expression after 45 days of *P. marinus* exposure. Moreover, Huvet *et al.* [108] suggested that PRN protects cell hosts against the reactive oxygen intermediate (ROI) in *C. gigas* inoculated with *Vibrio splendidus*. The over-expression of HSP70 and PRN in challenged larvae indicates that these proteins could play similar functions in cytoprotection and immunity, as has been suggested in *C. virginica* larvae [47].

Immunity

Oysters lack a specific immune response and immunological memory, and therefore they rely totally on their innate immune system to overcome diseases. The innate immune system of invertebrates employs cellular and humoral components that operate in a coordinated way to provide protection from invading micro-organisms [11]. The first action of the oyster's immune system when challenged by micro-organisms is recognition of these foreign invading organisms. This is achieved by oyster immune receptors interacting with a highly conserved set of molecular structural motifs present on the surface of micro-organisms that are absent from host cells, allowing the discrimination between self and non-self [93]. In this study, four genes were selected to investigate non-self recognition (GAL8, cLEC, AGL, LBP/BPI). While GAL8 showed no change, cLEC was activated after 24h of pathogen challenge and LBP/BPI and AGL after 48h. The increased cLEC and AGL expressions observed in this study are related to genes coding for a c-type lectin 1 and for

an a-agglutinin attachment subunit, respectively. Agglutinins and lectins are glycoproteins specialized in the recognition of specific pathogen-associated carbohydrate structures and cause the agglutination of cells, opsonation, the promotion of cellular adhesion, and the mediation of the innate immune response [109-112]. They have been detected in several bivalve species, and their implications in immune properties have been demonstrated [113-116]. Lectin activity in adult *C. gigas* has been shown to increase after 6h of exposure to *Vibrio anguillarum* [117]. In invertebrates, LPS binding proteins (LBP) participate in the transduction of cellular signals, inducing activation of the immune response [118]. BPI (bactericidal-permeability-increasing protein) is a 55-kDa cationic protein that is specifically active against Gram-negative bacteria (as *V. coralliilyticus*); it increases the permeability of the bacterial membranes. BPI is accumulated extracellularly, where it opsonizes bacteria. This action enhances phagocytosis by neutrophils [119]. LBP and BPI are structurally related, with a 45% sequence similarity [120]. The LBP/BPI gene used in this study has been identified in the screening of the *C. gigas* hemocyte EST library using genomic and transcriptomic approaches [121]. Recently, Gonzalez *et al.* [120] demonstrated that this gene encodes for a BPI-related protein. The activation of LBP/BPI following bacterial challenge suggests that this gene actively participates in the first line of defense at the larval stage, as suggested by Tirape *et al.* [10]. Interestingly, in the same study, it had observed that the expression of galectin 8 (GAL8), another lectin family, was not activated after bacterial challenge in *C. gigas* spat, coinciding with our results.

Upon successful recognition of invading micro-organisms, signalling cascades are triggered for the initiation of immune responses and for the transcription of inducible immune-related proteins. Several components (α IKK, REL, MYD88, ECSIT, TRAF, I κ B) of the Rel/NF- κ B signalling pathway have recently been characterized in *C. gigas* adults [122, 121, 123] and/or larvae [10]. The Rel and nuclear factor- κ B (Rel/NF- κ B) signalling pathway induces the transcription of numerous genes involved in immune function and inflammation [124]. Rel/NF- κ B proteins mediate cellular responses to a wide variety of stimuli by regulating the expression of a large set of genes mainly involved in immune responses. Over the past decade, the Rel/NF- κ B signal transduction pathway appeared to be

a key component of the immune response because of its involvement in both innate immunity in multicellular organisms and adaptive immunity in vertebrates [124-125]. In our study, we observed a higher expression of REL, MYD88, and TRAF in challenged larvae. In *C. gigas*, the activation of the Rel/NF- κ B pathway probably through Toll-like receptors led to the successive recruitment of intermediate messengers (MyD88, TRAF, ECSIT) and then to the formation of the activated IKK complex, which allows the ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the I κ B inhibitor. Consequently, REL subunits are released and translocated to the nucleus to drive the transcription of Rel/NF- κ B target genes [123, 126]. The over-expression of TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase) in challenged larvae after 48h could be related to activation of the Rel/NF- κ B pathway. Indeed, as described in Montagnani *et al.* [127], the presence of three κ B-motifs in the TIMP promoter suggests that TIMP gene expression might be controlled by the oyster's Rel/NF- κ B pathway. TIMP in oysters has been reported to be involved in wound healing and defense mechanisms [128]. Its function in the immune response might be linked to its ability to inhibit protease and metalloproteinase, two key components of bacterial infectivity [129]. It has been demonstrated that TIMP mRNA accumulation in haemocytes was indiscriminately induced following the injection of proteases produced by Gram-negative bacteria or a metalloproteinase extracted from a Gram-positive bacterium [127]. These results suggested that TIMP activation in response to infection was independent of a non-self recognition step of bacterial compounds. This hypothesis is in accordance with our results, where the stimulation by the Gram-negative *V. coralliilyticus* induced the activation of genes related to non-self recognition and the over-expression of TIMP. Although it has not been demonstrated in bivalves, the Rel/NF- κ B pathway is known to activate phospholipase A2 in invertebrates, especially insects [130-131]. Interestingly, this observation was also made in humans for the AA15 lipoxigenase [132]. These authors found that the Rel/NF- κ B pathway plays an important function in eicosanoid regulation. Our results for genes associated with PLA2, AA15LX, and Rel/NF- κ B suggest that this situation could prevail in *C. gigas* larvae after pathogen exposure.

Activation of the immune response in challenged larvae was revealed by increases in TAL and DRAC3 transcript abundance. Both these genes are used as hematopoiesis markers and allow the investigation of haemocyte differentiation. Detection of DRAC3 and DRAC3 transcripts at the gastrula–trochophore stages demonstrated that hematopoiesis is present earlier during larval development [10]. In the same study, it was suggested that bacterial stimulation induces haemocyte differentiation as shown by increases in Cg-tal and DRAC3.

Finally, another reaction to the bacterial challenge in oyster larvae is the coding of genes for antimicrobial peptides (Defh2). Antimicrobial peptides are among the most important effectors of innate immunity and display a variety of action mechanisms, killing microbes by membrane disruption or by altering metabolic processes such as septum formation or nucleic acid and protein syntheses related to cell walls [133]. Defh2 is a defensin-like protein that has been identified in oyster species, like *C. gigas* and *C. virginica* [134-135], and characterized [136-137]. After a bacterial challenge, the level of Cg-defh2 transcripts decreases dramatically in the circulating haemocyte population, and this decrease can be correlated with an increase of Cg-defh2 transcripts in gill and mantle tissues, suggesting a possible migration of the hemocytes expressing Defh2 towards tissues implicated in the oyster's first defense barrier [136].

Conclusion

The main objective of this study was to characterize the response of oyster larvae to pathogen infection using a multidisciplinary approach. Our results demonstrated that stimulation with *V. coralliilyticus* induced (1) a decline in feeding activity, which changed the energy status of Pacific oyster larvae (energy reserve consumption, β -oxidation, decline of metabolic rate); (2) fatty acid remodelling of polar lipids (changes in PI and LPC composition, NMI accumulation, lower content of major C₂₀ PUFA, activation of phospholipase and lipoxygenase); (3) the activation of antioxidant defenses (catalase, superoxide dimutase, periredoxin) and cytoprotective processes (heat shock protein 70,

pernin); and (4) the activation of the immune response (non-self recognition, NF- κ B signalling pathway, haematopoiesis, eiconosoides, antimicrobial peptide). In this case the immune responses seemed to be well adapted since the *V. coralliilyticus* provoked moderated mortality and it disappeared from challenged larval culture. This overall view allowed to better understand how larvae reacts face to the infection. It will be interesting to compare these responses with those which occurred after metamorphosis and in adult and to know if they are modulated in function of the type of pathogens (virus, species of vibrio,...).

Acknowledgments

The authors are grateful to IFREMER and LEMAR staff for oyster production and for their support during analyses. Thanks are addressed to Laure Devine for linguistic revision. This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Réseau Aquacole du Québec to R.T.

Bibliographic references

- 1 Thomas, A. M. & Rudolf, V. H. W. 2010. Challenges of metamorphosis in invertebrate hosts: maintaining parasite resistance across life-history stages. *Ecol. Entomol.* **35**, 200-205.
- 2 Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R., Venier, P. & Figueras, A. 2008. Study of Diseases and the Immune System of Bivalves Using Molecular Biology and Genomics. *Rev. Fish.* **16**, 133-156.
- 3 Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C. & Gallo, G. 2002. 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**, 325-334.

- 4 Paillard, C., Le Roux, F. & Borrego, J. J. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* **17**, 477–498.
- 5 Elston, R. A. 1980. Functional anatomy, histology and ultrastructure of soft tissues of the larval American oyster *Crassostrea virginica*. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* **70**, 65-93.
- 6 Mitta, G., Hubert, F., Dyrinda, E. A., Boudry, P. & Roch, P. 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* **24**, 381-393.
- 7 Dyrinda, E. A., Pipe, R. K. & Ratcliffe, N. A. 1995. Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae. *Fish Shellfish Immunol.* **5**, 569-580.
- 8 Dyrinda, E. A., Pipe, R. K. & Ratcliffe, N. A. 1997. Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res.* **289**, 527-536.
- 9 Luna-Gonzalez, A., Maeda-Martinez, A. N., Ascencio-Valle, F. & Robles-Mungaray, M. 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* **16**, 287-294.
- 10 Tirape, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandembulcke, F. & Boulo, V. 2007. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 859-873.
- 11 Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. & Pruzzo, C. 2002. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Techniq.* **57**, 469–476.

- 12 Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. & Nicolas, J. L. 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection* **8**, 2715-2724.
- 13 Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. & Paillard, C. 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immun.* **15**, 225-240.
- 14 Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J. & Samain, J. F. 2007. In vitro modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture* **270**, 413-421.
- 15 Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C. & Nicolas, J.-L. 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 367-379.
- 16 Lambert, C., Soudant, P., Degremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F., Huvet, A. & Samain, J. F. 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* **270**, 276-288.
- 17 Samain, J. F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, H., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, S., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J. L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Gereth, F., Boutet, I., Burgeot, T. & Boudry, P. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with

- physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* **268**, 227-243.
- 18 Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D. & Tremblay, R. submitted. Physiological and biochemical changes during premetamorphic development in American oyster *Crassostrea virginica* in relation to mortality emergence.
- 19 Gale, L. D., Manzi, J. J. & Crosby, M. P. 1991. Energetic Costs to the Eastern Oyster *Crassostrea-Virginica* Due to Recent Parasitism by the Ectoparasitic Gastropod *Boonea-Impressa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **79**, 89-98.
- 20 Ward, J. E. & Langdon, C. J. 1986. Effects of the ectoparasite *Boonea (Odostomia) Impressa* (Say) *Gastropoda pyramidellidae*, on the growth rate, filtration rate and valve movements of the host *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **99**, 163-180.
- 21 Flye-Sainte-Marie, J., Pouvreau, S., Paillard, C. & Jean, F. 2007. Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **349**, 378-389.
- 22 Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. & Samain, J.-F. 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **163**, 209-219.
- 23 Holland, D. L. & Spencer, B. E. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **53**, 287-298.

- 24 Pernet, F., Bricelj, V. M. & Cartier, S. 2006. Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **329**, 265-280.
- 25 Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. & Samain, J.-F. 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **173**, 163-179.
- 26 Langdon, C. J. & Waldock, M. I. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **61**, 431-440.
- 27 Smith, W. L. & Murphy, R. C. 2003. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: VANCE, D. E. & VANCE, J. E. (eds.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4 th ed. Amsterdam: Elsevier Science.
- 28 Bell, J. G. & Sargent, J. R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* **218**, 491-499.
- 29 Pernet, F., Bricelj, M. V. & Parrish, C. C. 2005. Effect of varying dietary levels of ω 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **327**, 115-133.
- 30 Plante, S., Pernet, F., Hache, R., Ritchie, R., Ji, B. & McIntosh, D. 2007. Ontogenetic variations in lipid class and fatty acid composition of haddock larvae *Melanogrammus aeglefinus* in relation to changes in diet and microbial environment. *Aquaculture* **263**, 107-121.

- 31 Walne, P. R. 1970. Studies on the Food Value of Nineteen Genera of Algae to Juvenile Bivalves of the Genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish Invest* **26**, 1-61.
- 32 Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goic, N., Moal, J., Suquet, M., Gueguen, M., Sunila, I. & Soudant, P. 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* **9**, 427-439.
- 33 Pernet, F., Barret, J., Marty, C., Moal, J., Le Gall, P. & Boudry, P. 2010. Environmental anomalies, energetic reserves and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **401**, 129-146.
- 34 Dubois, M., Gillies, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of carbohydrates and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
- 35 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- 36 Childress, J. J. & Somero, G. N. 1979. Depth-related enzyme activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts *Mar. Biol.* **52** 272-283.
- 37 Bailey, D. M., Genard, B., Collins, M. A., Rees, J.-F., Unsworth, S. K., Battle, E. J. V., Bagley, P. M., Jamieson, A. J. & Priede, I. G. 2004. High swimming and metabolic activity in the deep-sea eel *Synaphobranchus kaupii* revealed by integrated in situ and in vitro measurements. *Physiol. Bioch. Zool.* **78**, 335-346.

- 38 Smith, I. K., Vierheller, T. L. & Thorne, C. A. 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* **175**, 408-413.
- 39 Legendre, P. & Anderson, M. J. 1999. Distance-based redundancy analysis: Testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecol. Monogr.* **69**, 1-24.
- 40 Legendre, P. & Legendre, L. 1998. *Numerical ecology*, Amsterdam, Elsevier.
- 41 Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M. C., Hoste, B., Swings, J. & Rosenberg, E. 2003. *Vibrio coralliilyticus* sp nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 309-315.
- 42 Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. & Gibson, L. 2009. Two pathogens of Greenshell (TM) mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. *J. Fish Dis.* **32**, 499-507.
- 43 Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. & Gibson, L. F. 2009. Challenge of New Zealand Greenshell (TM) mussel *Perna canaliculus* larvae using two *Vibrio* pathogens: a hatchery study. *Dis. Aquat. Org.* **86**, 15-20.
- 44 Douillet, P. 1993. Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **98**, 123-134.
- 45 Moran, A. L. & Manahan, D. T. 2004. Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **306**, 17-36.

- 46 Garcia-Esquivel, Z., Bricelj, V. M. & Felbeck, H. 2002. Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **133**, 63-77.
- 47 Genard, B., Moraga, D., Pernet, F., David, E., Boudry, P. & Tremblay, R. submitted. Expression of candidate genes related to metabolism, immunity, cellular stress, and cell regulation during premetamorphic massive mortality in the American oyster *Crassostrea virginica* in relation to biochemical and physiological approaches. *gene*.
- 48 Meyer, E., Green, A. J., Moore, M. & Manahan, D. T. 2007. Food availability and physiological state of sea urchin larvae (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Mar. Biol.* **152**, 179-191.
- 49 Estes, R. M., Friedman, C. S., Elston, R. A. & Herwig, R. P. 2004. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* **58**, 223–230.
- 50 Derewenda, Z. S. 1994. Structure and function of lipases. *Adv. prot. chem* **45**, 1-52.
- 51 Sewell, M. A. 2005. Utilization of lipids during early development of the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **304**, 133-142.
- 52 Agnihotri, G. & Liu, H. W. 2003. Enoyl-CoA hydratase: Reaction, mechanism, and inhibition. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 9-20.
- 53 Bartlett, K. & Eaton, S. 2004. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur. J. Biochem.* **271**, 462-469.

- 54 Stewart, J. M., Carlin, R. C., Macdonald, J. A. & Vaniderstine, S. 1994. Fatty-Acid-Binding Proteins And Fatty-Acid Catabolism In Marine-Invertebrates, Peroxisomal Beta-Oxidation. *Invertebr. Reprod. Dev.* **25**, 73-82.
- 55 Heid, H. W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H. R. & Keenan, T. W. 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* **294**, 309-321.
- 56 Hirsch, E., Costa, C. & Ciruolo, E. 2007. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J. Endocrinol.* **194**, 243-256.
- 57 Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 329-341.
- 58 Lacoste, A., De Cian, M.-C., Cueff, A. & Poulet, S. A. 2001. Noradrenaline and α -adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *J. Cell. Sci.* **114**, 3557-3564.
- 59 Koutsogiannaki, S. & Kaloyianni, M. 2010. Signaling molecules involved in immune responses in mussels. *Inv. Surv. J.* **7**, 11-21.
- 60 Birgbauer, E. & Chun, J. 2006. New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2695-2701.
- 61 Kabarowski, J. H. S., Xu, Y. & Witte, O. N. 2002. Lysophosphatidylcholine as a ligand for immunoregulation. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 161-167.

- 62 Schmitz, G. & Ruebsaamen, K. 2010. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* **208**, 10-18.
- 63 Pernet, F., Bricelj, V. M. & Parrish, C. C. 2005. Effect of varying dietary levels of omega 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **327**, 115-133.
- 64 Rico-Villa, B., Le Coz, J. R., Mingant, C. & Robert, R. 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **256**, 377-388.
- 65 Barnathan, G. 2009. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie* **91**, 671-678.
- 66 Klingensmith, J. S. 1982. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids* **17**, 976-981.
- 67 Ackman, R. G. & Hooper, S. N. 1973. Non-methylene-interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: a comparison of two molluscs (*Littorina littorea* and *Lunatia triseriata*) with the sand shrimp (*Crangon septemspinus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* **46B**, 153-165.
- 68 Kraffe, E., P. Soudant, Y. Marty 2004. Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plamalogens in some marine bivalves. *Lipids* **39**, 59-66.
- 69 Glaser, C., Heinrich, J. & Koletzko, B. 2010. Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metab.-Clin. Exp.* **59**, 993-999.

- 70 Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P. & Jacobsson, A. 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* **49**, 186-199.
- 71 Geay, F., Culi, E. S. I., Corporeau, C., Boudry, P., Dreano, Y., Corcos, L., Bodin, N., Vandeputte, M., Zambonino-Infante, J. L., Mazurais, D. & Cahu, C. L. 2010. Regulation of FADS2 expression and activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed a vegetable diet. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **156**, 237-243.
- 72 Tocher, D. R., Zheng, X. Z., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J. R. & Teale, A. J. 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: Cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl Delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* **41**, 1003-1016.
- 73 Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G. & Sorgeloos, P. 2003. Supplementation of EPA and DHA emulsions to a *Dunaliella tertiolecta* diet: effect on growth and lipid composition of scallop larvae, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* **217**, 613-632.
- 74 Laing, I., Child, A. R. & Janke, A. 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **70**, 1-12.
- 75 Linkous, A. & Yazlovitskaya, E. 2010. Cytosolic phospholipase A2 as a mediator of disease pathogenesis. *Cell Microbiol.* **12**, 1369-1377.
- 76 Kuhn, H. & O'donnell, V. B. 2006. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* **45**, 334-356.

- 77 Funk, C. D. 2006. Lipoxygenase pathways as mediators of early inflammatory events in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1204-1206.
- 78 Stanley, D., Miller, J. & Tunaz, H. 2009. Eicosanoid Actions in Insect Immunity. *J. Innate Immun.* **1**, 282-290.
- 79 Tunaz, H., Park, Y., Buyukguzel, K., Bedick, J. C., Aliza, A. R. N. & Stanley, D. W. 2003. Eicosanoids in insect immunity: Bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A(2) activity in tobacco hornworms. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **52**, 1-6.
- 80 Hurtado, M. A., Reza, M., Ibarra, A. M., Wille, M., Sorgeloos, P., Soudant, P. & Palacios, E. 2009. Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E-2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture* **294**, 300-305.
- 81 Osada, M., Nishikawa, M. & Nomura, T. 1989. Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol., C.* **94**, 595-601.
- 82 Ruggeri, B. & Thoroughgood, C. A. 1985. Prostaglandins in aquatic fauna: a comprehensive review. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **23**, 301-306.
- 83 Saintsing, D. G., Hwang, D. H. & Dietz, T. H. 1983. Production of prostaglandins E₂ and F₂ alpha in the freshwater mussel *Ligumia subrostrata*: relation to sodium transport. *Pharmacology* **226**, 455-461.

- 84 Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Seguineau, C. & Samain, J. F. 2006. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* **41**, 567-576.
- 85 Exton, J. H. 2002. Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett.* **531**, 58-61.
- 86 Sethu, S., Pushparaj, P. N. & Melendez, A. J. 2010. Phospholipase D1 Mediates TNF alpha-Induced Inflammation in a Murine Model of TNF alpha-Induced Peritonitis. *Plos One* **5**.
- 87 Bachère, E., Hervio, D. & Mialhe, E. 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **11**, 173-180.
- 88 Pipe, R. K. 1992 Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* **16**, 111-122.
- 89 Bugge, D. A., Hegaret, H., Wikfors, G. H. & Allam, B. 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **23**, 188-196.
- 90 Liu, C. H., Tseng, M. C. & Cheng, W. 2007. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* **23**, 34-45.
- 91 Zoysa, M. D., Pushpamali, W. A., Oh, C., Whang, I., Kim, S. J. & Lee, J. 2008. Transcriptional up-regulation of disk abalone selenium dependent glutathione peroxidase by H₂O₂ oxidative stress and *Vibrio alginolyticus* bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* **25**, 446-57.

- 92 Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R. & Coustau, C. 2007. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 657-671.
- 93 Green, T. J. & Barnes, A. C. 2009. Inhibitor of REL/NF-B-K is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible. *Fish Shellfish Immunol.* **27**, 260-265.
- 94 Manevich, Y., Shuvaeva, T., Dodia, C., Kazi, A., Feinstein, S. I. & Fisher, A. B. 2009. Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Arch. Biochem. Biophys.* **485**, 139-149.
- 95 Dandapat, J., Chainy, G. B. N. & Rao, K. J. 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **135**, 221-233.
- 96 Nohl, H., Gille, L. & Staniek, K. 2005. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 719-723.
- 97 Nohl, H., Kozlov, A. V., Gille, L. & Staniek, K. 2003. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1308-1311.
- 98 Lindquist, S. & Craig, E. A. 1988. The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.

- 99 Daugaard, M., Rohde, M. & Jaattela, M. 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *Febs Lett.* **581**, 3702-3710.
- 100 Huang, L., Mivechi, N. F. & Moskophidis, D. 2001. Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: Analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8575-8591.
- 101 Deane, E. E., Li, J. & Woo, Y. S. 2004. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. *Dis. Aquat. Org.* **62**, 205-215.
- 102 Iwanaga, S. & Lee, B. L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 128-150.
- 103 Brown, D. C., Bradley, B. P. & Paynter, K. T. 1993. The physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Induction of stress proteins. *J. Shellfish. Res.* **12**, 135-136.
- 104 Song, L. S., Wu, L. T., Ni, D. J., Chang, Y. Q., Xu, W. & Xing, K. Z. 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol.* **21**, 335-345.
- 105 Scotti, P. D., Dearing, S. C., Greenwood, D. R. & Newcomb, R. D. 2001. Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (*Bivalvia* : *Mytilidae*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* **128**, 767-779.

- 106 Gauthier, J. D. & Vasta, G. R. 1994. Inhibition Of In-Vitro Replication Of The Oyster Parasite *Perkinsus-Marinus* By The Natural Iron Chelators Transferrin, Lactoferrin, And Desferrioxamine. *Dev. Comp. Immunol.* **18**, 277-286.
- 107 Tanguy, A., Guo, X. M. & Ford, S. E. 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C-gigas*) oysters. *Gene* **338**, 121-131.
- 108 Huvet, A., Herpin, A., Degremont, L., Labreuche, Y., Samain, J. F. & Cunningham, C. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* **343**, 211-220.
- 109 Geijtenbeek, T. B. H., Van Vliet, S. J., Engering, A., T Hart, B. A. & Van Kooyk, Y. 2004. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 33-54.
- 110 Mcgreal, E. P., Martinez-Pomares, L. & Gordon, S. 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol. Immunol.* **41**, 1109-1121.
- 111 Drickamer, K. 1999. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 585-590.
- 112 Sharon, N. & Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiol.* **14**, 53R-62R.
- 113 Takahashi, K. G., Kuroda, T. & Muroga, K. 2008. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **150**, 45-52.

- 114 Yamaura, K., Takahashi, K. G. & Suzuki, T. 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **149**, 168-175.
- 115 Minamikawa, M., Hine, M., Russell, S., Huber, P., Duignan, P. & Lumsden, J. S. 2004. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chiletin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. *Fish Shellfish Immunol.* **17**, 463-476.
- 116 Tunkijjanukij, S., Giaever, H., Chin, C. C. Q. & Olafsen, J. A. 1998. Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **119**, 705-713.
- 117 Olafsen, J. A., Fletcher, T. C. & Grant, P. T. 1992. Agglutinin Activity in Pacific Oyster (*Crassostrea-Gigas*) Hemolymph Following In vivo *Vibrio-Anguillarum* Challenge. *Dev. Comp. Immunol.* **16**, 123-138.
- 118 Ottaviani, E. 2006. Review. Molluscan immunorecognition. *Inv. Surv. J.* **3**, 50-63.
- 119 Iovine, N. M., Elsbach, P. & Weiss, J. 1997. An opsonic function of the neutrophil bactericidal permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10973-10978.
- 120 Gonzalez, M., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzon, D., Romestand, B., Fievet, J., Pugnieri, M., Roquet, F., Escoubas, J. M., Vandenbulcke, F., Levy, O., Saune, L., Bulet, P. & Bachere, E. 2007. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17759-17764.

- 121 Gueguen, Y., Cadoret, J. P., Flament, D., Barreau-Roumiguiere, C., Girardot, A. L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E. & Escoubas, J. M. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* **303**, 139-145.
- 122 Escoubas, J. M., Briant, L., Montagnani, C., Hez, S., Devaux, C. & Roch, P. 1999. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Lett.* **453**, 293-298.
- 123 Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J. M. & Escoubas, J. M. 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappa B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett.* **561**, 75-82.
- 124 Niederberger, E. & Geisslinger, G. 2010. Analysis of NF-kappa B signaling pathways by proteomic approaches. *Expert Review of Proteomics* **7**, 189-203.
- 125 Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. 2009. The NF-kappa B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **1**.
- 126 Montagnani, C., Labreuche, Y. & Escoubas, J. M. 2008. Cg-I kappa B, a new member of the I kappa B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 182-190.
- 127 Montagnani, C., Avarre, J. C., De Lorgeril, J., Quiquand, M., Boulo, V. & Escoubas, J. M. 2007. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 1-11.

- 128 Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F. & Escoubas, J. M. 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *Febs Letters* **500**, 64-70.
- 129 Miyoshi, S. & Shinoda, S. 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **2**, 91-98.
- 130 Shrestha, S. & Kim, Y. 2010. Activation of immune-associated phospholipase A(2) is functionally linked to Toll/Imd signal pathways in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 530-537.
- 131 Tanji, T., Hu, X. D., Weber, A. N. R. & Ip, Y. T. 2007. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4578-4588.
- 132 Bolick, D. T., Orr, A. W., Whetzel, A., Srinivasan, S., Hatley, M. E., Schwartz, M. A. & Hedrick, C. C. 2005. 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factor-kappa B. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2301-2307.
- 133 Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238-250.
- 134 Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J. M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P. & Bachere, E. 2006. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas* - Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**, 313-323.

- 135 Seo, J. K., Crawford, J. M., Stone, K. L. & Noga, E. J. 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1998-2004.
- 136 Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., De Lorgeril, J., Romestand, B. & Bachere, E. 2007. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 332-339.
- 137 Schmitt, P., Wilmes, M., Pugniere, M., Aumelas, A., Bachere, E., Sahl, H. G., Schneider, T. & Destoumieux-Garzon, D. 2010. Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action: oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II. *J. Biol. Chem.* **285**, 29208-29216.

Electronic supplementary materials

S1. DGGE gels, BLAST results, and sequencing

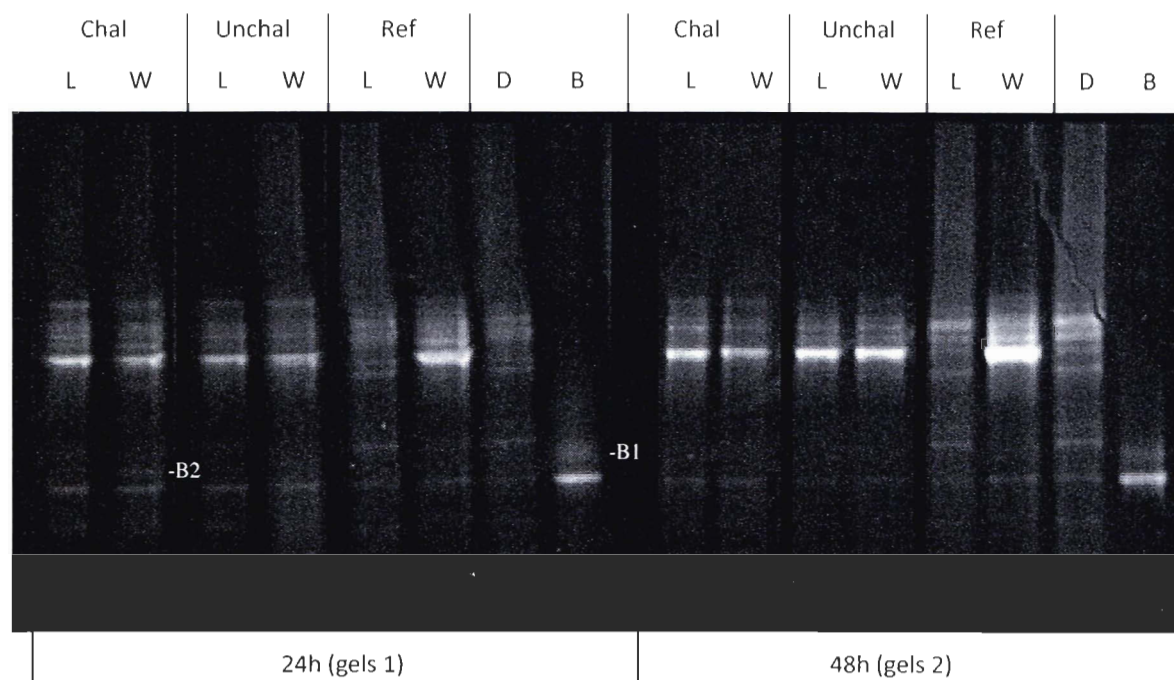


Figure 4.5. DGGE gels performed with 16s cDNA extracted from larvae (L) and surrounding water (W). Profiles were compared with (Chal) or without (Unchal) bacterial challenge treatment and after 24h and 48h of experiment. The cDNA from reference sample (Ref), diet (D) and bacterial control (B) was used as ladder. Due to their high similarity, cDNA from duplicate were pooled. B1 and 2 correspond to the retrieved bands used to *Vibrio corallilyticus* detection by sequencing analysis.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      305      315      325      335      345      355
strain YB1  TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG
strain 2J33 TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG
LMG 20984  TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG
LMG 21349  TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG
LMG 10953  TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG
Brest     TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG
B1       -----TACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG
B2       -----TACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      365      375      385      395      405      415
strain YB1  GGGCAAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC
strain 2J33 GGGCAAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC
LMG 20984  GGGCAAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC
LMG 21349  GGGCAAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC
LMG 10953  GGGCAAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC
Brest     GGGCAAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC
B1       GGGCCAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG TATGAAGGAG GCCTTCGGGT TGTAAGTCC
B2       GGGCCAGCC TGATGCAGCA ATGCCGCGTG CATGAAGGAG GCCTTCGGGT TGTAAGTCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      425      435      445      455      465      475
strain YB1  TTTTCAGCAGT GAGGAAGGTG GTAGTGTAA TAGCNCNTTC ATTTGACGTT AGCTGCAGAA
strain 2J33 TTTTCAGCAGT GAGGAAGGTG GTAGTGTAA TAGCNCNTTC ATTTGACGTT AGCTGCAGAA
LMG 20984  TTTTCAGCAGT GAGGAAGGTG GTAGTGTAA TAGCNCNTTC ATTTGACGTT AGCTGCAGAA
LMG 21349  TTTTCAGCAGT GAGGAAGGTG GTAGTGTAA TAGCNCNTTC ATTTGACGTT AGCTGCAGAA
LMG 10953  TTTTCAGCAGT GAGGAAGGTG GTAGTGTAA TAGCNCNTTC ATTTGACGTT AGCTGCAGAA
Brest     TTTTCAGCAGT GAGGAAGGTG GTAGTGTAA TAGCNCNTTC ATTTGACGTT AGCTGCAGAA
B1       TTTTCAGCAAT GAGGAACGTT GTACTGTAA TAGCACTAGG ATTTGACGTT AGTTGCAGAA
B2       TTTTCAGCAGT AAGGAACGTG GTAGTGTAA TAGCCTTATC ATTTGACGTT AGCTGCAGAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      485      495      505      515      525      535
strain YB1  GAAGCACCGG CTAACTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCG AGCGTTAATC
strain 2J33 GAAGCACCGG CTAACTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCG AGCGTTAATC
LMG 20984  GAAGCACCGG CTAACTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCG AGCGTTAATC
LMG 21349  GAAGCACCGG CTAACTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCG AGCGTTAATC
LMG 10953  GAAGCACCGG CTAACTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCG AGCGTTAATC
Brest     GAGGCACCGG CTAACTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAAGGTGCG AGCGTTAATC
B1       GAGGCACCGG CTAACTCCGT GCCAGCGACC GCGGTAAT-----

```

Figure 4.6. Alignment of *Vibrio corallilyticus* 16s sequences. B1 and 2 correspond to the sequences of DGGE retrieved bands.

Table 4.2. BLAST results for retrieved band B1.

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
AJ885032.1	<i>Vibrio corallilyticus</i> partial 16S rRNA gene, strain 2J33	<u>197</u>	197	100%	2e-53	82%
AJ440004.1	<i>Vibrio corallilyticus</i> partial 16S rRNA gene, strain LMG 21349	<u>185</u>	185	100%	2e-49	81%
AJ316167.1	<i>Vibrio</i> sp. LMG 10953 16S rRNA gene, strain LMG 10953	<u>185</u>	185	100%	2e-49	81%
NR_028014.1	<i>Vibrio corallilyticus</i> strain YB1 16S ribosomal RNA, partial sequence					
>emb AJ440005.1	<i>Vibrio corallilyticus</i> partial 16S rRNA gene, type strain LMG 20984	<u>183</u>	183	100%	5e-49	81%

Table 4.3. BLAST results for retrieved band B2.

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
NR_028014.1	Vibrio corallilyticus strain YB1 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ440005.1 Vibrio corallilyticus partial 16S rRNA gene, type strain LMG 20984	<u>168</u>	168	100%	1e-44	79%
AJ440004.1	Vibrio corallilyticus partial 16S rRNA gene, strain LMG 21349	<u>163</u>	163	100%	5e-43	79%
AJ316167.1	Vibrio sp. LMG 10953 16S rRNA gene, strain LMG 10953	<u>163</u>	163	100%	5e-43	79%
AJ885032.1	Vibrio corallilyticus partial 16S rRNA gene, strain 2J33	<u>158</u>	179	100%	2e-41	100%

S2. Response variables: means and statistics.

Table 4.4. Summary of data (Mean \pm STD) for larval performance and energetic metabolism.

Functional groups	RV	Unity	Mean \pm STD					RDA results				Multiple comparisons			
			Ref	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal	Time	Challenge	Interaction	All	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal
Larval performance	Mortality	%	0	13.23 \pm 0.34	4.56 \pm 0.02	16.89 \pm 2.07	7.28 \pm 1.07	10.53	86.39	0.23	97.14	b	c	a	c
Larval performance	Shell length	μ m	135	135.71 \pm 18.41	134.89 \pm 18.18	139.38 \pm 18.89	137.41 \pm 18.81	16.04	5.18	0.20	21.42	a	a	a	a
Larval performance	Clearance rate	n cell larva-1 day-1	5102.04	5298.86 \pm 565.15	4912.41 \pm 1367.3	1440.49 \pm 659.48	4813.07 \pm 347.19	35.44	20.17	31.97	87.58	a	a	b	a
Metabolism	AS6	Relative expression	1	0.86 \pm 0.09	0.67 \pm 0.32	1.26 \pm 0.73	9.6 \pm 2.92	35.54	27.18	29.78	92.51	b	b	b	a
Metabolism	CCO _i	Relative expression	1	0.83 \pm 0.1	0.61 \pm 0.12	0.76 \pm 0.21	2.72 \pm 0.09	34.24	24.84	39.64	98.72	a	a	a	a
Metabolism	CS-G	Relative expression	1	0.86 \pm 0.41	0.48 \pm 0.22	3.44 \pm 1.32	4.22 \pm 0.18	87.85	0.36	2.99	91.20	b	b	a	a
Metabolism	Enofase	Relative expression	1	0.48 \pm 0.35	1.19 \pm 0.01	0.96 \pm 0.28	0.89 \pm 0.25	2.34	25.91	38.51	66.75	a	a	a	a
Metabolism	GS	Relative expression	1	0.58 \pm 0.26	0.95 \pm 0.53	0.52 \pm 0.17	0.54 \pm 0.12	17.76	11.84	9.28	38.88	a	a	a	a
Metabolism	NADHox	Relative expression	1	1.1 \pm 0.19	0.63 \pm 0.3	0.89 \pm 0.03	2.27 \pm 0.67	27.43	10.95	45.96	84.34	b	b	b	a
Metabolism	Glucids	ng glucids larva-1	1.68	1.28 \pm 0.3	1.44 \pm 0.1	1.21 \pm 0.09	1.34 \pm 0.38	4.38	12.45	0.21	17.05	a	a	a	a
Metabolism	Protein	ng protein larva-1	39.57	40.9 \pm 1.57	37.86 \pm 0.33	38.01 \pm 0.21	43.43 \pm 2.49	7.02	5.55	70.17	82.74	ab	b	b	a
Metabolism	PK-A	pmol larva-1 min-1	4.14	5.13 \pm 0.62	3.22 \pm 0.06	6.05 \pm 0.41	8.69 \pm 0.32	64.31	0.82	32.78	97.92	b	c	b	a
Metabolism	CCO-A	pmol larva-1 min-1	0.29	0.45 \pm 0.05	0.49 \pm 0.04	0.47 \pm 0.03	0.62 \pm 0.02	27.50	44.72	13.75	85.96	b	b	b	a
Metabolism	CS-A	pmol larva-1 min-1	11.67	9.15 \pm 1.93	8.2 \pm 0.6	8.69 \pm 0.64	9.44 \pm 0.36	4.80	0.29	22.60	27.69	a	a	a	a

RDA results correspond to the variance percentage of each response variable (RV) explained by RDA for each explicative variable (time, challenge and interaction of both) considered individually or together (all). Multiple comparisons show the significant differences (letters) between each combination of treatments (24 and 48h chal : larvae challenged during 24 and 48h ; 24 and 48h unchal : unchallenged larvae after 24 and 48h).

Table 4.5. Summary of data (Mean ± STD) for neutral lipids.

Functional groups	RV	Unity	Mean ± STD				RDA results				Multiple comparisons				
			Ref	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal	Time	Challenge	Interaction	All	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal
Lipids classes	ALC	mass %	1,69	1.13 ± 0.18	1.02 ± 0.32	1.73 ± 0.45	1.36 ± 0.2	44,97	12,08	3,63	60,68	a	a	a	a
Lipids classes	DG-MG	mass %	3,09	3.43 ± 0.18	3.76 ± 0.19	2.86 ± 0.24	2.22 ± 0.4	72,44	1,78	16,20	90,41	ab	a	b	b
Lipids classes	FFA	mass %	4,83	2.53 ± 0.02	3.07 ± 0.15	6.51 ± 0.08	2.16 ± 0.03	19,71	30,43	49,73	99,87	c	b	a	d
Lipids classes	ST	mass %	23,24	13.32 ± 1.34	13.69 ± 1.83	17.61 ± 0.82	13.87 ± 2.48	27,70	15,67	23,37	66,75	a	a	a	a
Lipids classes	TAG	mass %	67,15	79.59 ± 1.69	78.47 ± 2.49	71.28 ± 0.94	80.39 ± 3.12	16,41	25,65	42,12	84,18	a	a	b	a
Lipids classes	TLN	ng lipids larva-1	3,86	4.71 ± 1.1	4.35 ± 0.89	2.09 ± 0.13	4.7 ± 0.23	22,29	21,90	37,86	82,06	a	a	b	a
Fatty acids (neutral)	14_0	mass %	9,11	7.51 ± 0.55	7.65 ± 1.59	7.41 ± 0.19	8.59 ± 0.49	7,29	17,96	11,16	36,41	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	16_0	mass %	11,28	11.36 ± 0.58	11.08 ± 0.02	11.42 ± 0.12	12.02 ± 0.3	36,39	3,62	28,12	68,13	ab	b	a	a
Fatty acids (neutral)	16_1(n_7)	mass %	4,84	4.04 ± 0.31	3.99 ± 0.01	3.6 ± 0.1	3.75 ± 0.14	60,58	1,14	5,03	66,76	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	16_2(n_7)	mass %	1	0.81 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.89 ± 0.02	0.62 ± 0.07	12,51	31,48	48,11	92,09	a	a	a	b
Fatty acids (neutral)	18_0	mass %	2,26	2.66 ± 0.63	2.15 ± 0.07	1.93 ± 0.81	2.51 ± 0.34	3,77	0,11	32,41	36,29	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	18_1(n_7)	mass %	6,96	6.85 ± 0.16	6.77 ± 0.28	6.79 ± 0.01	6.76 ± 0.16	1,91	4,68	1,49	8,08	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	18_1(n_9)	mass %	9,53	10.47 ± 0.26	10.82 ± 0.34	10.48 ± 0.27	10.48 ± 0.23	11,39	12,50	12,47	36,36	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	18_2(n_6)	mass %	3,79	4.02 ± 0.24	4.02 ± 0.19	4.13 ± 0.06	4.12 ± 0.11	16,36	0,01	0,02	16,38	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	18_3(n_3)	mass %	5,56	5.35 ± 0.16	5.49 ± 0.21	5.09 ± 0.06	5.1 ± 0.14	66,22	3,72	2,40	72,34	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	18_4(n_3)	mass %	15,97	14.55 ± 0.31	14.84 ± 0.39	12.9 ± 0.19	13.43 ± 0.48	84,29	5,99	0,48	90,76	a	a	b	b
Fatty acids (neutral)	20_1(n_7)	mass %	3	3.37 ± 0.09	3.36 ± 0.15	4 ± 0.13	3.58 ± 0.16	59,38	14,62	14,06	88,06	b	b	a	b
Fatty acids (neutral)	20_4(n_3)	mass %	1,04	1.18 ± 0.02	1.16 ± 0.03	1.24 ± 0.04	1.13 ± 0.01	1,86	52,98	24,59	79,42	a	ab	a	b
Fatty acids (neutral)	20_4(n_6)	mass %	0.93 ± 0.06	0.89 ± 0.04	1.17 ± 0.01	1 ± 0.11	0.13 ± 0.01	48,51797	33,8974	2,186505	84,60	b	b	a	ab
Fatty acids (neutral)	20_5(n_3)	mass %	3,76	4.72 ± 0.31	4.9 ± 0.01	5.89 ± 0.05	4.83 ± 0.25	31,47	19,93	40,18	91,57	b	b	a	b
Fatty acids (neutral)	22_5(n_6)	mass %	1,24	1.48 ± 0.09	1.5 ± 0.08	1.65 ± 0.05	1.56 ± 0.03	49,33	5,57	11,39	66,30	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	22_6(n_3)	mass %	10,51	10.82 ± 0.37	11.11 ± 0.37	11.83 ± 0.28	11.15 ± 0.16	37,91	5,10	31,71	74,72	b	ab	a	a
Fatty acids (neutral)	MUFA	mass %	26,54	26.93 ± 0.77	26.81 ± 1.1	27.09 ± 0.48	26.89 ± 0.51	1,16	2,16	0,10	3,42	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	NMI	mass %	1,72	2.07 ± 0.19	1.8 ± 0.05	2.2 ± 0	2.04 ± 0.27	24,21	34,12	1,86	60,18	a	a	a	a
Fatty acids (neutral)	PUFA	mass %	48,93	49.77 ± 1.12	50.72 ± 0.39	50.5 ± 0.39	48.13 ± 0.17	17,69	10,18	56,09	83,95	ab	a	a	b
Fatty acids (neutral)	SFA	mass %	24,54	23.3 ± 1.88	22.47 ± 1.49	22.42 ± 0.87	24.98 ± 0.34	8,76	9,89	37,84	56,49	a	a	a	a

RDA results correspond to the variance percentage of each response variable (RV) explained by RDA for each explicative variable (time, challenge and interaction of both) considered individually or together (all). Multiple comparisons show the significant differences (letters) between each combinaison of treatments (24 and 48h chal : larvae challenged during 24 or 48h ; 24 and 48h unchal : unchallenged larvae after 24 and 48h).

Table 4.6. Summary of data (Mean \pm STD) for polar lipids.

Functional groups	RV	Unity	Mean \pm STD					RDA results				Multiple comparisons			
			Ref	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal	Time	Challenge	Interaction	All	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal
Lipids classes	CAEP	mass %	13,73	11.72 \pm 2.43	10.81 \pm 0.73	11.61 \pm 0.91	9.48 \pm 1.16	6.84	30.68	5.00	42.53	a	a	a	a
Lipids classes	CARDIO	mass %	8,14	5.55 \pm 0.74	6.1 \pm 0.86	6.17 \pm 1.07	5.06 \pm 0.48	2,12	3,60	32,12	37,84	a	a	a	a
Lipids classes	LPC	mass %	10,45	4.04 \pm 0.98	6.7 \pm 0.23	5.31 \pm 1.44	10.26 \pm 1.12	24,55	60,81	5,54	90,90	b	b	a	a
Lipids classes	PC	mass %	14,08	24.65 \pm 0.84	28.75 \pm 5.43	26.64 \pm 3.37	29.36 \pm 6.71	2,97	20,39	0,84	24,20	a	a	a	a
Lipids classes	PE	mass %	20,63	29.03 \pm 2.91	25.93 \pm 1.74	28.08 \pm 1.13	27.06 \pm 2.3	0,06	29,59	7,52	37,17	a	a	a	a
Lipids classes	PI	mass %	25,07	18.14 \pm 0.84	15.06 \pm 2.02	17.03 \pm 0.87	13.84 \pm 1.98	8,52	61,70	0,02	70,24	a	ab	a	b
Lipids classes	PS	mass %	5,19	4.25 \pm 1.18	4.26 \pm 0.56	3.25 \pm 0.49	2.81 \pm 0.09	57,93	1,85	2,02	61,80	a	a	a	a
Lipids classes	SM	mass %	2,7	2.64 \pm 0.04	2.4 \pm 0.25	1.91 \pm 2	2.12 \pm 0.55	10,14	0,01	2,03	12,18	a	a	a	a
Lipids classes	TLP	ng lipids larva-1	7,3	8.71 \pm 0.58	8.56 \pm 0.49	10.77 \pm 0.46	10.83 \pm 1.6	73,51	0,03	0,17	73,71	a	a	a	a
Fatty acids (polar)	14_0	mass %	2,33	1.84 \pm 0.21	1.93 \pm 0.09	1.36 \pm 0.1	1.78 \pm 0.71	20,75	14,23	5,44	40,42	a	a	a	a
Fatty acids (polar)	16_0	mass %	12,22	13.27 \pm 0.58	11.45 \pm 1.65	12.16 \pm 0.31	10.83 \pm 1.64	12,11	39,95	0,98	53,04	a	a	a	a
Fatty acids (polar)	16_1(n_7)	mass %	1,62	1.16 \pm 0.03	1.14 \pm 0.07	0.9 \pm 0.02	0.84 \pm 0.08	90,32	1,99	0,66	92,97	a	a	b	b
Fatty acids (polar)	17_1(n_7)	mass %	4,66	4.85 \pm 0.17	8.27 \pm 1.42	7.74 \pm 0	5.92 \pm 1.57	0,76	6,44	69,88	77,08	b	a	a	ab
Fatty acids (polar)	18_0	mass %	3,5	2.44 \pm 0.03	2.31 \pm 0.01	2.37 \pm 0.2	2.36 \pm 0.33	0,08	6,12	4,57	10,77	a	a	a	a
Fatty acids (polar)	18_1(n_7)	mass %	5,94	5.57 \pm 0.2	5.43 \pm 0	5.35 \pm 0.09	4.38 \pm 0.04	44,88	33,49	18,93	97,30	a	a	a	b
Fatty acids (polar)	18_1(n_9)	mass %	4,81	2.94 \pm 0.03	2.46 \pm 0.17	2.43 \pm 0.06	2.27 \pm 0.14	44,67	37,22	8,84	90,73	a	b	b	b
Fatty acids (polar)	18_2(n_6)	mass %	2,05	1.41 \pm 0.06	1.24 \pm 0.1	1.04 \pm 0.13	2.27 \pm 0.12	12,32	31,08	54,16	97,56	b	b	b	a
Fatty acids (polar)	18_3(n_3)	mass %	3,2	1.89 \pm 0.03	1.9 \pm 0.05	1.47 \pm 0.02	2.11 \pm 0.04	5,04	49,03	44,60	98,67	b	b	c	a
Fatty acids (polar)	18_4(n_3)	mass %	8,2	4.69 \pm 0.09	5.25 \pm 0.35	4.05 \pm 0.05	5.41 \pm 0.32	4,75	73,03	12,89	90,67	b	ab	b	a
Fatty acids (polar)	20_1(n_11)	mass %	1,85	1.71 \pm 0.17	1.78 \pm 0.2	2.12 \pm 0.2	1.74 \pm 0.05	20,91	14,60	31,31	66,82	a	a	a	a
Fatty acids (polar)	20_1(n_7)	mass %	4,93	4.07 \pm 0.11	3.93 \pm 0.12	4.22 \pm 0.17	3.4 \pm 0.11	8,23	55,72	27,78	91,73	a	a	a	b
Fatty acids (polar)	20_4(n_6)	mass %	2,34	2.43 \pm 0.09	2.33 \pm 0.01	2.12 \pm 0.09	3.86 \pm 0.12	19,47	35,46	44,23	99,16	b	b	b	a
Fatty acids (polar)	20_5(n_3)	mass %	6,84	7.8 \pm 0.39	7.87 \pm 0.03	8.25 \pm 0.05	8.83 \pm 0.23	64,27	13,64	8,38	86,29	b	b	ab	a
Fatty acids (polar)	22_2	mass %	5,21	7.86 \pm 0.01	5.91 \pm 0.49	8.26 \pm 0.25	5.57 \pm 0.2	0,02	94,53	2,42	96,97	a	b	a	b
Fatty acids (polar)	22_5(n_6)	mass %	2,36	2.54 \pm 0.17	2.86 \pm 0.06	2.18 \pm 0.07	3.53 \pm 0.05	2,44	69,53	25,92	97,89	c	b	d	a
Fatty acids (polar)	22_6(n_3)	mass %	18,01	19.64 \pm 0.69	19.65 \pm 0.01	19.95 \pm 0	22.97 \pm 1.15	37,80	26,23	25,76	89,79	b	a	b	a
Fatty acids (polar)	MUFA	mass %	25,23	21.75 \pm 0.3	24.41 \pm 1.03	24.28 \pm 0.24	19.79 \pm 1.53	6,65	5,13	77,47	89,25	b	a	ab	b
Fatty acids (polar)	NMI	mass %	7,37	10.91 \pm 0.09	8.14 \pm 0.51	11.62 \pm 0.22	7.53 \pm 0.25	0,02	94,89	3,56	98,47	a	b	a	b
Fatty acids (polar)	PUFA	mass %	54,87	58.81 \pm 0.67	58.4 \pm 0.84	58.22 \pm 0.07	63.84 \pm 1.45	25,14	29,03	38,84	93,01	b	b	b	a
Fatty acids (polar)	SFA	mass %	19,9	19.44 \pm 0.97	17.19 \pm 1.87	17.5 \pm 0.17	16.38 \pm 2.98	16,15	24,19	2,71	43,06	a	a	a	a
Fatty acids (polar)	N-Pind	PI	213,55	219.26 \pm 6.37	225.43 \pm 3.26	229.66 \pm 3.53	216.52 \pm 1.83	0,40	8,71	66,85	75,97	ab	a	a	b
Fatty acids (polar)	P-Pind	PI	273,69	292.2 \pm 6.58	300.96 \pm 5.75	292.69 \pm 0.13	333.14 \pm 11.72	21,70	49,21	20,40	91,31	b	b	b	a

RDA results correspond to the variance percentage of each response variable (RV) explained by RDA for each explicative variable (time, challenge and interaction of both) considered individually or together (all). Multiple comparisons show the significant differences (letters) between each combination of treatments (24 and 48h chal : larvae challenged during 24 and 48h ; 24 and 48h unchal : unchallenged larvae after 24 and 48h).

Table 4.7. Summary of data (Mean \pm STD) for lipids-related genes.

Functional groups	RV	Unity	Mean \pm STD				RDA results				Multiple comparisons				
			Ref	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal	Time	Challenge	Interaction	All	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal
Lipids genes	AA15LX	Relative expression	1	2.19 \pm 0.57	1.37 \pm 0.35	8.76 \pm 3.08	1.69 \pm 0.47	28.07	36.80	23.15	88.02	b	b	a	b
Lipids genes	ADH	Relative expression	1	2.94 \pm 0.2	1.99 \pm 0.97	5.9 \pm 1.93	1.96 \pm 0.28	16.84	46.85	17.50	81.18	b	b	a	b
Lipids genes	Delta5	Relative expression	1	0.58 \pm 0.14	0.4 \pm 0.36	1.64 \pm 0.2	0.47 \pm 0.19	28.67	40.34	21.22	90.23	b	b	a	b
Lipids genes	Delta9	Relative expression	1	0.7 \pm 0.46	0.58 \pm 0.35	0.79 \pm 0.34	1.4 \pm 0.86	20.47	6.10	13.66	40.23	a	a	a	a
Lipids genes	EDL	Relative expression	1	0.6 \pm 0.07	0.29 \pm 0.01	0.42 \pm 0.04	1.1 \pm 1.03	10.81	3.64	26.67	41.12	a	a	a	a
Lipids genes	ECH	Relative expression	1	2.89 \pm 1.38	0.55 \pm 0.22	4.09 \pm 0.38	0.67 \pm 0.39	4.34	81.73	2.86	88.93	a	b	a	b
Lipids genes	Delta6	Relative expression	1	0.54 \pm 0	0.15 \pm 0.06	2.67 \pm 0.85	0.27 \pm 0.01	27.55	42.33	22.25	92.13	b	b	a	b
Lipids genes	Lipstor	Relative expression	1	0.47 \pm 0.43	0.23 \pm 0.12	1.58 \pm 0.1	1.43 \pm 0.06	89.96	2.62	0.16	92.74	b	b	a	a
Lipids genes	PCtrans	Relative expression	1	2.89 \pm 3.39	1.03 \pm 1.07	4.66 \pm 1.93	1.89 \pm 1.15	10.70	33.21	1.27	45.18	a	a	a	a
Lipids genes	PLD1	Relative expression	1	1.56 \pm 0.92	1.5 \pm 0.24	5.4 \pm 0.5	1.96 \pm 0.67	40.70	27.00	25.22	92.93	b	b	a	b
Lipids genes	PLA2	Relative expression	1	0.51 \pm 0.46	0.16 \pm 0.09	2.17 \pm 0.59	0.09 \pm 0.04	20.07	46.95	24.00	91.02	b	b	a	b
Lipids genes	Psdecar	Relative expression	1	1.3 \pm 0.94	0.59 \pm 0.27	2.45 \pm 1.93	0.98 \pm 0.61	13.42	26.46	3.26	43.16	a	a	a	a
Lipids genes	ACS	Relative expression	1	2.25 \pm 0.65	0.84 \pm 0.01	4.11 \pm 0.03	2.56 \pm 0.53	55.71	38.04	0.08	93.82	b	c	a	b

RDA results correspond to the variance percentage of each response variable (RV) explained by RDA for each explicative variable (time, challenge and interaction of both) considered individually or together (all). Multiple comparisons show the significant differences (letters) between each combination of treatments (24 and 48h chal : larvae challenged during 24 or 48h ; 24 and 48h unchal : unchallenged larvae after 24 and 48h).

Table 4.7. Summary of data (Mean \pm STD) for parameters associated to immunity and cellular stress.

Functional groups	RV	Unity	Mean \pm STD					RDA results				Multiple comparisons			
			Ref	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal	Time	Challenge	Interaction	All	24h Chal	24h Unchal	48h Chal	48h Unchal
Immunity	AGL	Relative expression	1	0.77 \pm 0.19	0.33 \pm 0.35	4.25 \pm 0.69	0.29 \pm 0.27	26,39	42,96	27,54	96,89	b	b	a	b
Immunity	ANX6	Relative expression	1	0.76 \pm 0.27	0.47 \pm 0.32	1.95 \pm 0.4	1.25 \pm 0.31	65,60	16,81	2,92	85,33	b	b	a	ab
Immunity	Defn2	Relative expression	1	0.6 \pm 0.26	0.14 \pm 0.04	1.81 \pm 0.49	0.3 \pm 0.3	24,39	50,55	14,58	89,52	b	b	a	b
Immunity	DRAC3	Relative expression	1	1.17 \pm 0.42	2.73 \pm 0.47	1.1 \pm 0.03	0.59 \pm 0.2	43,98	9,87	38,43	92,28	b	a	b	b
Immunity	ECSIT	Relative expression	1	3.11 \pm 1.32	1.71 \pm 1.64	1.46 \pm 1.46	2.49 \pm 1.92	2,76	0,51	21,53	24,79	a	a	a	a
Immunity	GAL8	Relative expression	1	1.11 \pm 0.61	1.07 \pm 0.06	0.65 \pm 0.48	0.03 \pm 0.01	53,28	10,14	8,11	71,53	a	a	ab	b
Immunity	LBP/BPI	Relative expression	1	8.28 \pm 2.34	1.5 \pm 0.34	8.86 \pm 4.31	2.14 \pm 0.9	0,63	78,01	0,00	78,65	a	b	a	ab
Immunity	MAPK	Relative expression	1	0.8 \pm 0.05	2.81 \pm 3.51	2.81 \pm 3.25	1.78 \pm 1.55	1,53	1,56	15,06	18,15	a	a	a	a
Immunity	MYD88	Relative expression	1	11.33 \pm 1.09	1.58 \pm 1.39	2.01 \pm 0.17	0.46 \pm 0.39	35,13	41,14	21,61	97,89	a	b	b	b
Immunity	REL	Relative expression	1	0.96 \pm 0.59	0.63 \pm 0.21	3.61 \pm 0.61	1.81 \pm 0.31	63,55	19,56	9,45	92,56	b	b	a	b
Immunity	TAL	Relative expression	1	0.37 \pm 0.28	0.18 \pm 0.05	1.81 \pm 0.73	0.37 \pm 0.06	32,87	32,66	19,26	84,79	b	b	a	b
Immunity	TIMP	Relative expression	1	1.55 \pm 0.39	0.35 \pm 0.11	6.03 \pm 1.58	1.68 \pm 0.71	41,75	38,20	12,19	92,14	b	b	a	b
Immunity	TRAF	Relative expression	1	0.45 \pm 0.45	0.52 \pm 0.39	3.52 \pm 0.59	0.95 \pm 0.85	43,39	22,12	24,41	89,92	b	b	a	b
Immunity	clEC	Relative expression	1	3.44 \pm 0.52	0 \pm 0	0.09 \pm 0.03	0.01 \pm 0	31,68	35,03	31,77	98,48	a	b	b	b
Cellular stress	CAT-G	Relative expression	1	3.04 \pm 0.4	0.65 \pm 0.7	7.45 \pm 0.7	1.72 \pm 1.06	26,83	59,05	10,06	95,95	b	b	a	b
Cellular stress	ecSOD	Relative expression	1	0.3 \pm 0.42	0.14 \pm 0.18	0.36 \pm 0.5	0.49 \pm 0.18	14,50	0,08	6,81	21,40	a	a	a	a
Cellular stress	GPX3	Relative expression	1	0.66 \pm 0.32	0.73 \pm 0.36	1.55 \pm 0.92	0.99 \pm 0	32,13	5,88	9,57	47,59	a	a	a	a
Cellular stress	GPX5	Relative expression	1	1.59 \pm 0.08	0.83 \pm 0.53	2.7 \pm 0.21	1.74 \pm 0.07	52,31	38,44	0,52	91,27	b	b	a	b
Cellular stress	GR-G	Relative expression	1	0.57 \pm 0.24	0.13 \pm 0.02	2.19 \pm 0.66	0.15 \pm 0.17	21,73	49,23	20,61	91,57	b	b	a	b
Cellular stress	HSP70	Relative expression	1	1.24 \pm 0.95	1.02 \pm 0.46	5.79 \pm 1.5	0.83 \pm 0.06	25,28	35,80	29,92	91,00	b	b	a	b
Cellular stress	Metallo	Relative expression	1	0.64 \pm 0.31	0.61 \pm 0.54	0.93 \pm 0.16	1.3 \pm 0.01	46,21	5,44	7,87	59,53	a	a	a	a
Cellular stress	PRDX4	Relative expression	1	0.45 \pm 0.3	0.36 \pm 0.26	2.79 \pm 0.14	1.59 \pm 0.25	79,04	10,33	7,73	97,09	c	c	a	b
Cellular stress	PRDX5	Relative expression	1	0.79 \pm 0.06	0.86 \pm 0.89	2.61 \pm 0.19	0.82 \pm 0.1	27,95	26,47	30,72	85,14	b	b	a	b
Cellular stress	PRDX6	Relative expression	1	0.56 \pm 0.06	0.42 \pm 0.32	1.55 \pm 0.16	0.94 \pm 0.14	67,91	16,63	6,49	91,03	b	b	a	b
Cellular stress	PRN	Relative expression	1	0.65 \pm 0.1	0.09 \pm 0.04	1.64 \pm 0.3	0.67 \pm 0.21	46,35	44,91	3,17	94,43	b	c	a	b
Cellular stress	SOD-G	Relative expression	1	0.64 \pm 0.52	0.19 \pm 0.13	4.18 \pm 0.86	0.47 \pm 0.38	32,36	38,69	23,75	94,80	b	b	a	b
Cellular stress	TBARS	pmol larva-1	0,03	0.03 \pm 0	0.02 \pm 0	0.04 \pm 0	0.04 \pm 0	78,89	7,80	1,14	87,83	b	b	a	ab
Cellular stress	GPX-A	pmol larve-1 min-1	1,89	2.14 \pm 0.33	2.44 \pm 0.01	3.97 \pm 0.37	4.28 \pm 0.22	93,33	2,58	0,00	95,91	b	b	a	a
Cellular stress	GR-A	pmol larve-1 min-1	1,79	2.37 \pm 0.46	1.99 \pm 0.33	2.61 \pm 0.25	3.41 \pm 0.02	53,96	3,42	27,37	84,75	b	b	ab	a
Cellular stress	SOD-A	pmol larve-1 min-1	1193,29	1947.06 \pm 327.66	1548.88 \pm 20.73	2211.47 \pm 132.91	1145.76 \pm 378.37	0,61	68,14	14,17	82,92	a	ab	a	b
Cellular stress	CAT-A	pmol larve-1 min-1	60,92	102.51 \pm 5.19	86.86 \pm 5.89	123.28 \pm 0.55	93.72 \pm 3.15	24,27	64,99	6,16	95,43	b	b	a	b

RDA results correspond to the variance percentage of each response variable (RV) explained by RDA for each explicative variable (time, challenge and interaction of both) considered individually or together (all). Multiple comparisons show the significant differences (letters) between each combination of treatments (24 and 48h chal : larvae challenged during 24 or 48h ; 24 and 48h unchal : unchallenged larvae after 24 and 48h).

CONCLUSION

PRINCIPAUX RÉSULTATS ET CONTRIBUTION DE L'ÉTUDE

Dans ce projet de thèse, nous avons pour objectif de mieux comprendre les relations qui peuvent exister entre la physiologie larvaire, l'environnement bactérien et l'apparition de la mortalité en éclosion chez deux espèces d'huîtres commerciales. Peu d'informations étaient disponibles sur la nature de ces liens et les différents résultats présentés dans les chapitres précédents ont fourni une série de faits nouveaux dans le domaine. En plus d'aborder la problématique de la mortalité aux stades larvaires, l'originalité de ce travail réside dans le caractère intégratif des résultats obtenus. En effet, l'approche multidisciplinaire nous a permis d'aborder des changements physiologiques associés à l'apparition de la mortalité simultanément au travers de l'étude du métabolisme, des caractéristiques lipidiques, du stress cellulaire et de l'immunité, tout en intégrant des analyses enzymologiques, biochimiques et génomiques. Cette approche nous a permis d'aborder la problématique de la mortalité en éclosion dans deux situations différentes. Dans la première expérience, nous avons pu comparer le développement de larves d'huîtres américaines en présence ou non d'un antibiotique. Les analyses microbiologiques ont démontré que les larves non traitées par l'antibiotique se sont développées dans un environnement bactérien qui s'est modifié progressivement ce qui aurait permis la prolifération d'un pathogène opportuniste qui a induit *in fine* l'apparition de fortes mortalités. Cette approche a eu comme intérêt de pouvoir documenter les changements physiologiques associés à la dégradation progressive de l'environnement bactérien et à l'apparition d'une mortalité de masse. Dans la seconde expérience nous avons choisi de contrôler l'infection en ajoutant un pathogène connu pour causer des mortalités massives dans les bassins d'élevage de l'huître du Pacifique. Cette seconde approche vient compléter la première expérience sur plusieurs points. Tout d'abord, elle permet de caractériser les changements physiologiques associés à une infection bactérienne tout en contrôlant mieux les mortalités. Ensuite, vu que l'exposition aux pathogènes a été effectuée sur une courte

période (24 et 48h), elle permet de documenter les changements physiologiques subits par les larves dans les premiers moments de l'infection. Enfin, les nouvelles analyses qui ont été ajoutées dans cette expérience ont permis d'affiner et de compléter les observations faites dans la première expérience. D'une manière générale, tous les résultats présentés dans les chapitres précédents nous ont permis de proposer un schéma global (figure 5.1) illustrant les changements physiologiques associés aux infections bactériennes chez les larves d'huîtres. Ce schéma récapitulatif ainsi que les éléments qui nous ont permis de le proposer sont détaillés point par point dans la section suivante.

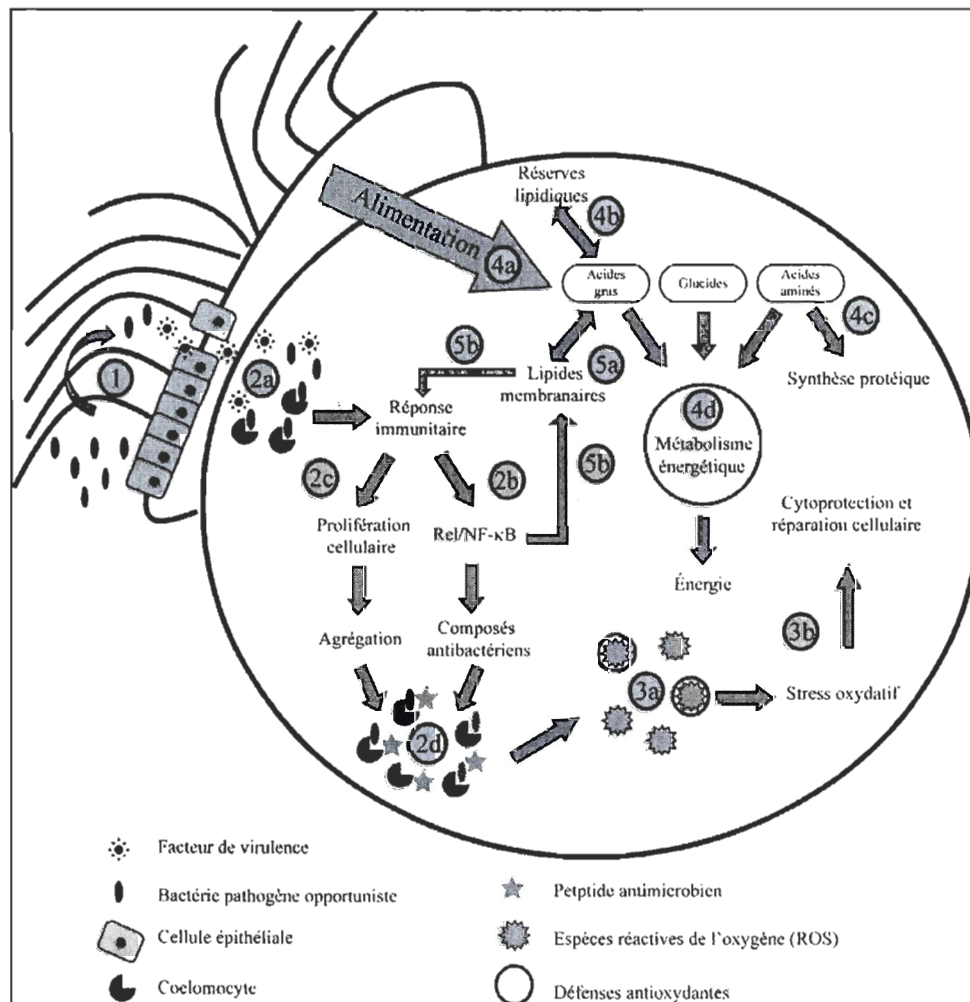


Figure 5.1. Schéma récapitulatif des changements associés à une infection bactérienne. Voir le texte pour les détails des points illustrés (chiffre dans les cercles gris).

1. Prolifération bactérienne et début de l'infection :

Le premier point de ce schéma représente la prolifération d'une bactérie pathogène opportuniste dans le milieu de culture des larves et la production par ceux-ci de facteurs de virulence qui vont progressivement induire la dégradation des cellules épithéliales et permettre la rentrée des bactéries pathogènes dans les tissus des larves (point 1 dans la figure 5.1). La nature des stimuli qui induisent la prolifération de ces bactéries est encore mal connue et leur étude ne faisait pas partie des objectifs de ce projet de thèse. Cependant, les approches microbiologiques ont montrées que l'apparition de la mortalité de masse coïncidait avec une modification profonde de l'environnement bactérien tant au niveau de la diversité, de la structure et de l'abondance. L'observation des symptômes de la nécrose bacillaire ainsi que les cultures sur plaque TCBS chez les larves moribondes nous a suggéré une infection bactérienne de type *vibrio* comme étant la cause de la mortalité de masse. Dans la deuxième expérience, la pathogène introduit pour le challenge est détectable seulement après 24 heures d'exposition. Ces différents résultats montrent que nous avons deux situations différentes dans les deux expériences effectuées. L'une où nous avons observé l'émergence progressive du pathogène sur plusieurs jours, conduisant à une explosion de la mortalité (mortalité massive) et une autre, où les larves ont été exposées sur une courte période à un pathogène dont la charge a diminué progressivement au cours de l'expérience, n'induisant pas de forte mortalité.

2. Activation de la réponse immunitaire :

L'activation de la réponse immunitaire débute avec la reconnaissance des bactéries pathogènes par les cellules immunitaires en circulation (ou cœlomocytes chez les larves d'huîtres) grâce à des protéines spécifiques de reconnaissance du soi (point 2a dans la figure 5.1). Lors de la première expérience, chez *C. virginica*, l'activation de cette première étape de la réponse immunitaire, nous a été suggérée par l'augmentation des niveaux d'expression de gènes codant pour des récepteurs à lectines (NK-rec et KC-rec), des

protéines spécialisées dans la reconnaissance des structures d'hydrate de carbones associés aux pathogènes. L'activation de gènes associés aux lectines (AGL et cLEC) ainsi qu'un gène codant pour une protéine se liant spécifiquement aux LPS bactériens (LPB/BPI) a été observée également après le challenge bactérien lors de la deuxième expérience. Tout ces résultats nous ont permis de montrer que l'activation de la réponse immunitaire se produit rapidement après l'exposition aux pathogènes, c'est-à-dire une semaine avant l'apparition de la mortalité de masse pour la première expérience et après 24 heures de challenge pour la deuxième. L'approche génomique nous a permis également de mettre en avant l'activation d'autres composantes de la réponse immunitaire. Une fois le pathogène reconnu, une succession de processus vont être mis en place pour permettre l'élimination du corps étranger. Un des plus étudié chez l'huître du pacifique est l'activation de la voie de signalisation Rel/NF- κ B (Escoubas *et al.*, 1999 ; Gueguen *et al.*, 2003 ; Montagnani *et al.*, 2004) qui permet la transcription de gènes cibles impliqués dans la réponse immunitaire (point 2b dans la figure 5.1). La surexpression de trois gènes (REL, TRAF, MYD88) impliqués dans la voie Rel/NF- κ B a été observée chez les larves challengées, confirmant l'activation de cette voie après une exposition à un pathogène chez *C. gigas* au stade larvaire (Tirapé *et al.*, 2007). Les différents gènes cibles activés par cette voie chez l'huître du pacifique sont encore mal connus. Seule l'activation de TIMP, un gène hématocytaire codant pour un inhibiteur de métalloprotéinase (un facteur de virulence chez les bactéries) est connue pour être contrôlée par la voie Rel/NF- κ B (Montagnani *et al.*, 2007). La surexpression de ce gène mesuré après 48h de challenge semble confirmer ce lien. Bien que cela n'aie pas encore été démontrée chez les bivalves, la voie Rel/NF- κ B est connue également pour activer la synthèse des peptides antimicrobiens chez d'autres invertébrés notamment chez les insectes (Uvell et Engstrom, 2007 ; Tanjii *et al.*, 2010). Les peptides antimicrobiens sont des éléments essentiels de l'immunité innée chez les invertébrés. Ils sont produit par les hémocytes et permettent la destruction des pathogènes en déstabilisant leur membranes cellulaires et/ou en affectant les processus métaboliques associés aux protéines et aux acides nucléiques. Lors de la deuxième expérience, nous avons observé simultanément à l'activation des gènes de la voie Rel/NF- κ B, une surexpression du gène

Defh2 codant pour un type de défensine, une famille de peptides antimicrobiens connue de l'huître de pacifique. Ces résultats suggèrent un lien entre la production de peptides antimicrobiens et la voie Rel/NF- κ B chez les larves de *C. gigas*. L'implication de la voie Rel/NF- κ B dans la synthèse d'inhibiteurs de protéase et de peptides antimicrobiens montre l'importance de cette voie dans la régulation de la réponse immunitaire surtout au niveau de la production de composés antimicrobiens par les cœlomocytes. L'approche moléculaire nous a permis également de montrer l'activation après le challenge bactérien d'une autre composante de la réponse immunitaire, la différenciation hémocytaires ou hématopoïèse (point 2c dans la figure 5.1). L'activation de ce processus immunitaire nous a été suggéré par les hauts niveaux d'expression de deux gènes (TAL et DRAC3) 48h après la stimulation des larves aux bactéries pathogènes. L'hématopoïèse est la première étape qui permet la prolifération et l'agrégation des cellules de l'immunité vers le site d'infection, induisant ainsi l'élimination des corps étrangers. Celle-ci implique l'action conjuguée des composés antibactériens et de processus phagocytaires (point 2d dans la figure 5.1). L'élimination en tant que tel des corps étrangers par les cœlomocytes est réalisée dans les phagosomes lorsque ceux-ci fusionnent avec les lysosomes. Lors de ce processus, les corps étrangers sont mis en contact avec des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par la poussée oxydative (Babior, 1984; Beutler, 2004). La haute réactivité de ces radicaux libres dégrade rapidement les corps phagocytés qui seront par la suite recyclés par voie enzymatique (lipase, protéase,...). Sur ce dernier point, la première expérience nous permis de mettre en avant l'activation d'un gène codant pour une protéase (cathepsine b) avant l'apparition des fortes mortalités chez *C. virginica*.

3. Stress oxydatif

Dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse que la production de ROS lors des mécanismes phagocytaires nécessaires à l'élimination des corps étrangers impliquait l'activation des défenses antioxydantes pour contrôler l'apparition d'un stress oxydatif chez les larves (point 3a dans la figure 5.1). Bien que suggéré dans le cadre du projet MOREST (Lambert *et al.*, 2007; Samain *et al.*, 2007) et dans plusieurs autres travaux (Lambert *et al.*

2003, Labreuche *et al.* 2006), l'importance des défenses antioxydantes et du stress oxydatif dans l'apparition de la mortalité de masse et dans les infections bactériennes n'avait pas été clairement démontrée avant les analyses réalisées dans cette thèse. Les résultats obtenus dans ce travail ont démontrés que l'apparition de fortes mortalité coïncidait avec l'activation des défenses antioxydantes ainsi bien au niveau enzymatique (catalase, superoxyde dismutase et glutathione peroxydase) qu'au niveau de l'expression génique (peroxyrédoxine 6). Des résultats similaires ont été obtenus après le challenge bactérien où on a observé une augmentation de l'activité de la SOD et de la CAT ainsi que la surexpression de 6 gènes associés aux défenses antioxydantes (GR-G, CAT-G, SOD-G, PRDX4, PRDX5 et GPX5) suite à l'exposition au pathogène. Les principales différences que l'on a observées entre les deux expériences se situaient d'une part au niveau de notre indicateur de stress oxydatif, le dosage des niveaux de peroxydation des lipides (MDA) où des niveaux plus élevés étaient associés avec l'apparition de la mortalité de masse mais pas après le challenge bactérien, et d'autre part au niveau de l'expression de la peroxyrédoxine 6 (PRDX6) qui était surexprimée une semaine avant l'apparition de la mortalité mais pas lors du challenge bactérien de la deuxième expérience. Ces différences nous ont amené à considérer deux choses. Tout d'abord, l'apparition du stress oxydatif semble dépendre de l'intensité et du niveau d'avancement de l'infection. En effet, dans la première expérience, une semaine avant l'apparition de la mortalité de masse, l'augmentation des défenses antioxydantes n'était pas associée avec des taux de peroxydation plus élevés, ce qui indique que les larves développaient des défenses antioxydantes adéquates pour éviter l'augmentation de la peroxydation des lipides. Ce n'est seulement que lorsque l'infection s'est généralisée et que la plupart des larves étaient sur le point de mourir que des niveaux plus importants en peroxydation des lipides ont été mesurés. Le cas de la PRDX6 semble également dépendre du niveau d'intensité de l'infection. Cela s'expliquerait par la capacité de cette enzyme à réparer les lipides peroxydés (Manevich *et al.*, 2009). Cette propriété de la PRDX6 expliquerait son activation lors de l'infection généralisée où des niveaux plus élevés de peroxydation des lipides ont été mesurés et justifierait l'absence de réponse lors

du challenge bactérien où aucuns changements n'avaient été observés au niveau de la peroxydation des lipides.

A coté des défenses antioxydantes, nous avons montré que les larves disposent de processus de cytoprotection pour se prémunir des dommages engendrés au niveau cellulaire (point 3b dans la figure 5.1). En effet, nous avons montrés que l'apparition de la mortalité coïncidait avec la surexpression de gènes codant pour des protéines liées au stress cellulaire (HSP70, perline, MYC-h). L'activation de ces gènes en condition pathologie chez des larves de bivalves a été montrée pour la première fois dans ce travail. Cependant, l'activation de HSP70 après un challenge bactérien chez des adultes été mesurée pour *C. virginica* (Brown *et al.*, 1993) et pour *Argopecten ventricosus* (Song *et al.*, 2006). De même, l'implication de la perline dans la gestion des infections bactériennes chez les bivalves adultes avait déjà été suggérée par Gauthier *et al.* (1994), Tanguy *et al.* (2004) et Huvet *et al.* (2004). Dans le cas du gène MYC-h, une surexpression avait observée en condition de stress physiologique tel que l'exposition aux hydrocarbures (Boutet *et al.*, 2004) et des conditions hypoxiques (David *et al.*, 2005b) chez *C. gigas*. Un autre aspect original de ce travail a été de mettre en avant l'activation de gènes (anexine et suppressine) impliqués dans la régulation des processus inflammatoire et de l'apoptose chez *C. virginica* lors de l'apparition de la mortalité, confirmant l'importance de ces processus dans la gestion de l'infection, comme cela à été récemment suggéré chez les adultes de la même espèce (Wang *et al.*, 2010)

4. Activité métabolique

Ce travail a démontré également que la prolifération des bactéries pathogènes et l'apparition de l'infection induisent des changements importants dans le métabolisme des larves. La première constatation que nous avons pu faire, c'est qu'une exposition à des bactéries pathogènes induit une diminution progressive de l'activité alimentaire des larves (point 4a dans la figure 5.1), voir même un arrêt complet de l'alimentation avant l'apparition de la mortalité de masse chez *C. virginica*. Ce changement dans l'activité alimentaire des larves coïncidait avec une métabolisation des réserves énergétiques (point

4b dans la figure 5.1) qui nous a été suggéré par des contenus plus faibles en triglycérides et en protéines, par des niveaux plus élevés en sous-produits du catabolisme des triglycérides (mono-diglycérides et acides gras libres), une surexpression de gènes associés à la β -oxydation (ADH, ECH et ACS) et par la sous-expression d'un gène associé au stockage des lipides de réserves (Lipstor). Bien que cela semble logique, il nous a été difficile de démontrer clairement l'augmentation de l'activité métabolique associée à l'activation de la réponse immunitaire. Le seul indice d'une augmentation de l'activité métabolique que nous avons pu mettre en avant est l'activation de deux gènes associés à la synthèse protéique (glutamine synthase et le facteur d'élongation Elf-2b) avant l'apparition de la mortalité de masse chez *C. virginica* (point 4c dans la figure 5.1). Par contre, nous avons pu montrer que lorsque l'activité alimentaire et le contenu en réserves énergétiques sont faibles, l'activité métabolique l'est également (point 4d dans la figure 5.1) tel que suggéré par les activités plus faibles des enzymes du métabolisme énergétique (PK, CS et CCO) et par la sous-expression de certains gènes associés à la production d'énergie (NDH-1, CC-1, AS-6, CCOi et NADHox), à la synthèse des protéines (GS et Elf-2B) et au stockage des lipides de réserve (Lipstor). Pour nous, ces observations suggèrent que lors d'une infection, le pathogène affecte la capacité des larves à s'alimenter, ce qui les oblige à se tourner vers leurs réserves énergétiques (lipides et protéines) pour trouver l'énergie nécessaire à leur maintien et pour soutenir les défenses immunitaires. Si les larves ne parviennent pas à endiguer l'infection, leur faible niveau d'alimentation ne permet plus de renouveler les réserves énergétiques, ce qui une fois celles-ci épuisées, diminue la disponibilité en substrat pour la synthèse d'ATP et l'activité du métabolisme énergétique. Cela n'est pas sans conséquence pour les larves qui se retrouvent dans une situation où elles ne disposent plus d'énergie ni pour se défendre, ni pour se développer. Bien que ce travail soit le premier à mettre en avant l'impact d'une infection bactérienne sur l'activité métabolique chez des larves de bivalves, des observations similaires ont été faites par Flye-Sainte-Marie *et al.* (2007) sur les juvéniles de palourde *Ruditapes philippinarum*. Ils avaient démontré que parallèlement au développement des symptômes de la maladie de l'anneau brun, le budget énergétique des juvéniles diminuait simultanément à l'altération

de leur activité alimentaire. Il est également intéressant de constater que nos résultats sur le contenu en réserves énergétiques et les niveaux d'activité du métabolisme énergétique sont similaires à ceux obtenus par Moran et Manahan (2004) décrivant l'impact du déficit alimentaire sur la physiologie des larves de *C. gigas*. Enfin, il est important de signaler que ce travail est le premier à utiliser les mesures d'expression de gènes pour mettre en évidence l'activation de la β -oxydation chez des larves de bivalves lors d'une infection bactérienne.

5. Lipides membranaires

Une des contributions importantes de ce travail a été de mettre en avant les changements encourus par les lipides membranaires lors d'une infection bactérienne (point 5a dans la figure 5.1). Au niveau des grandes classes, nous avons observés que l'émergence de la mortalité de masse chez *C. virginica* coïncidait avec une incapacité pour les larves d'accumuler des phospholipides. Cette constatation n'a pas été faite lors de la deuxième expérience mais l'étude plus approfondie des classes de phospholipides nous a révélé une augmentation de la proportion en phosphatidylinositol (PI) et une diminution en lysophosphatidylcholine (LPC) chez les larves challengées. L'incapacité à accumuler des phospholipides avait déjà été observée chez *C. gigas* lorsque les larves étaient en état de jeûne (Moran et Manahan, 2004). Ces résultats suggèrent que l'incapacité que nous observons pourrait être liée avec la faible activité alimentaire des larves. De plus, les faibles niveaux d'expression de l'EDL, un gène impliqué dans le transport des acides gras pour la synthèse des phospholipides, mesurés dans les larves moribondes indiquent une capacité de synthèse réduite pour les phospholipides. Cette situation ne se retrouve pas lors du challenge bactérien où les larves challengées accumulent autant de phospholipides que le contrôle et où aucune différence n'a été observée dans l'expression de l'EDL. Cela suggère que le contenu en phospholipides n'est pas affecté dans les premiers moments de l'infection. Bien que ce ne soit pas clairement démontré, nous avons relié les changements observés pour la PI et la LPC avec l'utilisation de certains de leurs dérivés pour la

médiation de la réponse immunitaire. Pour la PI cela avait déjà été suggéré chez plusieurs espèces de mollusques (Lacoste *et al.*, 2001; Koutsogiannaki et Kaloyianni, 2010).

Des modifications dans la composition en acides gras ont également été observées pour les lipides polaires dans les deux expériences. Les principales étant une augmentation de la proportion de NMI (essentiellement du 22:2 NMI), une incapacité à accumuler les acides gras essentiels dans les lipides polaires après le challenge bactérien, une incorporation préférentielle du DHA au dépend de l'EPA et une diminution de l'indice de peroxydation. Tous ces éléments suggèrent que les larves infectées sont incapables, probablement en raison de leur faible capacité alimentaire, d'accumuler des acides gras essentiels dont l'absence peut être compensée par l'accumulation de NMI (Barnathan, 2009). De plus, un contenu plus important en NMI dans les membranes pourrait compenser également la diminution de l'indice de peroxydation induite probablement par le stress oxydatif généré pendant l'infection. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les NMI sont plus résistants à l'oxydation (Klingensmith, 1982) et qu'ils augmenteraient la résistance des membranes face aux attaques des lipases bactérienne (Ackman et Hooper, 1973). L'incorporation préférentielle du DHA au dépend de l'EPA avait déjà été mise en avant chez d'autres bivalves (Delaunay *et al.*, 1993; Farias *et al.*, 2003; Pernet *et al.*, 2005). Ces changements au niveau biochimique se reflétaient au niveau moléculaire tel que suggéré par l'activation de plusieurs gènes du métabolisme des lipides. Ces gènes codent pour les désaturases 5 et 6, les phospholipases A1 et D2, et pour la AA15 lipoxigénase. C'est la première fois que la régulation de ces gènes a été étudiée chez des larves de bivalves. La comparaison entre les dosages biochimiques et leur fonction respective dans le métabolisme lipidique nous a amené à considérer les points suivants :

- L'implication des désaturases dans la synthèse des NMI.
- L'activation de la voie des eicosanoïdes (phospholipases A1 et AA15 lipoxigénase) après un challenge bactérien
- L'activation de la synthèse de l'acide lysophosphatidique (phospholipase D2) après un challenge bactérien.

L'implication des désaturases dans la synthèse de NMI est déjà bien démontrée chez les bivalves (Barnathan, 2009) mais leur activation après une infection bactérienne a été suggérée pour la première fois dans ce travail. L'activation de la voie des eicosanoïdes au travers des phospholipases et des lipoxigénases ainsi que son implication dans la réponse immunitaire est bien documentée chez les insectes (Tunaz *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2009). Chez les bivalves, les eicosanoïdes ont été étudiés dans plusieurs travaux (Saintsing *et al.*, 1983; Ruggeri et Thoroughgood, 1985; Osada *et al.*, 1989; Hurtado *et al.*, 2009) mais le lien avec l'activation de la réponse immunitaire n'est pas clairement défini. Cependant, plusieurs travaux sur l'importance de l'acide arachidonique, un précurseur des eicosanoïdes, sur les paramètres immunitaires de l'huître du pacifique ont été réalisés récemment (Delaporte *et al.*, 2006, Segueineau *et al.*, 2011). Concernant la régulation de la voie des eicosanoïdes, les résultats de la deuxième expérience ont montré que l'activation de la phospholipase A1 et la AA15 lipoxigénase correspondait à l'activation de la voie de signalisation Rel/NF- κ B suggérant une relation entre l'activation de cette voie et la synthèse des eicosanoïdes (point 5b dans la figure 5.1). Cette relation n'avait pas encore été suggérée chez les bivalves mais est bien définie chez les insectes et chez l'humain (Bolick *et al.*, 2005 ; Tanji *et al.*, 2007 ; Shrestha et Kim, 2010). L'activation de la synthèse de l'acide lysophosphatidique dans un contexte immunitaire a été démontrée chez les vertébrés (Exton, 2002; Sethu *et al.*, 2010), mais n'a jamais été abordée chez les invertébrés marins.

COMPARAISON DES GROUPES CONTRÔLES ET DÉVELOPPEMENT ONTOGÉNIQUE

Plusieurs informations ont pu être tirées de l'étude des groupes contrôles, tant au niveau de la qualité des élevages (performance larvaire) qu'au niveau ontogénique. Tout d'abord, au niveau de la qualité des élevages, pour *C. virginica* nous avons un groupe contrôle traité aux antibiotiques qui affichait des bons taux de survie mais une croissance et des niveaux en triglycérides faibles comparativement à ce qui avait déjà mesuré chez cette espèce (Chu et Webb 1984 ; Gallagher *et al.*, 1986). Les raisons de ces faibles performances

n'ont pas été clairement définies mais peuvent liées à la qualité de la ponte ou à la faible activité alimentaire des larves avant le 13^{ème} jour d'élevage. Le côté atypique de ce groupe contrôle peut également être vu dans l'incapacité de celui-ci à accumuler de l'acide arachidonique dans les lipides membranaires, contrairement à ce qui traditionnellement mesuré chez les larves de bivalves (Pernet *et al.*, 2005; Rico-Villa *et al.*, 2006). Pour *C. gigas*, le groupe contrôle, c'est-à-dire les larves qui n'ont pas été exposée au pathogène, on a mesuré pour la survie, la croissance, les niveaux d'alimentation et le contenu en triglycérides des valeurs proche de celles disponibles dans la littérature (Rico-Villa *et al.*, 2006), illustrant la bonne qualité de l'élevage. Bien que les mesures aient été effectuées sur une courte période (48h), nous avons observé une augmentation des acides gras polyinsaturés essentiels au court du temps, ce qui est également en accord avec la littérature. Malgré des performances larvaires différentes, nous avons pu mettre en avant certains points de comparaison entre les groupes contrôles qui nous ont permis de voir certains changements ontogéniques dans certains paramètres étudiés. Nous avons montré chez les deux espèces une augmentation de l'activité métabolique (citratesynthase et cytochrome oxydase) avec l'ontogénie (relation allométrique), du moins pour les stades véligères. Cette tendance à l'augmentation a également été mesurée pour les capacités antioxydantes (catalase, glutathionne peroxydase et superoxyde dismutase) et du niveau de peroxydation des lipides chez les deux espèces. Cela nous a indiqué une augmentation du stress oxydatif durant l'ontogénie, que nous avons relié avec l'augmentation de l'activité métabolique des larves, comme cela avait été suggéré chez la crevette *Macrobrachium malcolmsonii* (Dandapat *et al.*, 2003).

PERSPECTIVES

La réalisation de ce projet de thèse a permis de mettre de l'avant plusieurs éléments nouveaux sur la problématique de la mortalité en éclosérie chez deux espèces d'huître. Cependant, plusieurs points mériteraient d'être approfondis. Il serait intéressant d'évaluer de manière plus précise l'impact d'une infection bactérienne sur le métabolisme

énergétique des larves et de compléter nos données avec le modèle de budget énergétique développé par Flye-Sainte-Marie (2007). Nous avons observé qu'une modification de la composition en acides gras dans les lipides polaires était induite pendant l'infection sans déterminer si ces modifications affectaient plus particulièrement certaines classes de phospholipides. Ces informations pourraient être trouvées en effectuant des dosages spécifiques de la composition en acides gras dans les différentes classes de phospholipides. L'approche génomique nous a montré que les changements dans la composition lipidique des larves étaient associés à la surexpression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. On pense plus particulièrement, à l'activation des enzymes de la β -oxydation, des désaturases, des phospholipases et des lipoxygénases. Bien que ce travail soit le premier à mettre en évidence l'activation de ces enzymes en condition pathologique chez des larves de bivalves, les informations obtenues restent limitées et nécessiteraient des approches moléculaires plus précises pour mieux comprendre les voies de régulation de ces enzymes. Pour les phospholipases et les lipoxygénases, des dosages des prostaglandines, thromboxanes, et leucotriènes, permettraient d'améliorer les connaissances sur l'impact de l'activation de ces enzymes sur la synthèse des eicosanoïdes. L'étude du stress oxydatif a démontré l'importance des défenses antioxydantes et des processus de cytoprotection pour lutter contre les infections bactériennes. Cependant, le lien l'activation de la réponse immunitaire, la production de ROS, le stress oxydatif et l'activation des défenses antioxydantes reste encore à être démontré. Nous nous sommes intéressés aux enzymes antioxydantes et à certaines protéines de stress, mais l'étude de la gestion du stress oxydatif pourrait être élargie à d'autres composantes des défenses antioxydantes telles que les vitamines ou le glutathion. De plus, nous avons abordé l'impact du stress oxydatif via la peroxydation des lipides seulement. D'autres études pourraient compléter nos résultats en abordant les dommages subis au niveau de l'ADN et des protéines. Nous avons pu aussi mettre en avant l'augmentation des capacités antioxydantes avec l'ontogénie. Cependant, notre étude était limitée aux stades larvaires précédant la métamorphose. Il serait intéressant de compléter ces données en suivant l'évolution des défenses antioxydantes après la métamorphose. Cette étude serait d'autant plus intéressante vu qu'elle permettrait

de connaître le rôle des défenses antioxydantes dans la métamorphose. Enfin, l'approche génomique nous a permis de sélectionner une série de gènes candidats pour évaluer l'activation des défenses antioxydantes et de la réponse immunitaire. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de ces gènes au niveau moléculaire afin de mieux comprendre les voies de (co-)régulation. Notamment, il serait intéressant de voir s'il existe un lien entre la voie de signalisation NF- κ B et l'activation des défenses antioxydantes et des eicosanoïdes.

D'un point de vue plus général, la méthodologie utilisée dans ce projet pourrait être étendue à d'autres espèces de bivalves afin d'avoir des comparaisons interspécifiques. De même, dans le contexte actuel des mortalités estivales observées sur le naissain d'huîtres du pacifique en Europe, il serait intéressant d'utiliser une approche similaire pour évaluer l'impact d'une infection par un virus (virus herpétique dans le cas de la mortalité estivale) sur la physiologie des juvéniles. Dans un contexte aquacole, le projet a permis de mettre au point une méthodologie qui permet d'évaluer l'état physiologique des larves. Ce travail peut donc présenter un intérêt pour les projets qui veulent évaluer l'impact de nouvelles techniques d'écloserie sur l'état physiologique des larves. Par exemple, ce type d'approche multidisciplinaire pourrait être utilisée pour évaluer l'impact de l'utilisation de probiotiques ou de nouveaux types de bactéricide sur la physiologie larvaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackerman P. A., Iwama G. K., 2001. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to *vibriosis*. *J. Aquat. Anim. Health* 13, 173-180.
- Ackman R. G., Hooper S. N., 1973. Non-methylene-interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: a comparison of two molluscs (*Littorina littorea* and *Lunatia triseriata*) with the sand shrimp (*Crangon septemspinosus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 46B, 153-165.
- Adly A. M., 2010. Oxidative stress and disease: An updated review. *Res. J. Immunol.* 3, 129-145.
- Anderson R. S., Paynter K. T., Bureson E. M., 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biol. Bull.* 183, 476-481.
- Anguiano-Beltrán C., Lizárraga-Partida M. L., Searcy-Bernal R., 2004. Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* 59, 119-123.
- Ashton-Alcox K. A., Ford S. E., 1998. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue Cell.* 30 195-204.
- Babior B., 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J. Clinical Invest.* 73, 599-601.
- Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B., 2004. Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149-168.
- Bachère E., Hervio D., Mialhe E., 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 11, 173-180.

- Baker S. M., Mann R., 1994. Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and the effects of hypoxia on post-settlement ingestion rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 181, 239-253.
- Barnathan G., 2009. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie* 91, 671-678.
- Barreau-Roumiguiere C., Montagnani C., Escoubas J. M., 2003. Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 793-800.
- Bartlett B. R., 1979. Biochemical changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, 1795 during larval development and metamorphosis. *Proc. Natl. Shell. Ass.* 69, 202.
- Beckmann, N., Morse, M. and Moore, C., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 124-132.
- Begum N., Matsumoto M., Tsuji S., Toyoshima K., Seya T., 2000. The primary host defense system across humans, flies and plants. *Curr. Trends Immunol.* 3, 59-74.
- Berge J. P., Barnathan G., 2005. Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects, in: Y.L. Gal, R. Ulber (Eds.), *Marine Biotechnology I*. Springer-Verlag Berlin, Berlin, 49-125.
- Ben-Haim Y., Thompson F. L., Thompson C. C., Cnockaert M. C., Hoste B., Swings J., Rosenberg E., 2003. *Vibrio coralliilyticus* sp nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 309-315.
- Bergin D., Reeves E. P., Renwick J., Wientjes F. B., Kavanagh K., 2005. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: Identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect. Immun.* 73, 4161-4170.
- Beutler B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40, 845-859.

- Bolick D. T., Orr A. W., Whetzel A., Srinivasan S., Hatley, M. E., Schwartz M. A., Hedrick C. C., 2005. 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factor-kappa B. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2301-2307.
- Bollinger C. R., Teichgraber V., Gulbins E., 2005. Ceramide-enriched membrane domains. *Bioch. Biophys. Acta-Molecular Cell Res.* 1746, 284-294.
- Bourne D. G., Hoj L., Webster N. S., Swan J., Hall M. R., 2006. Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 260, 27-38.
- Boutet I., A.Tanguy, M. Auffret, N. Mujdzic and D. Moraga, 2003. Expression of HSP 70 in experimentally metal-exposed European flat oysters *Ostrea edulis*. *J. Shell. Res.* 22, 763-766.
- Boutet I., Tanguy A., Moraga D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147-157.
- Bramble L., Anderson R. S., 1997. Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. *Dev. Comp. Immunol.* 21 337-348.
- Brogden K. A., 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238-250.
- Brown C., 1973. The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 21, 215-223.
- Brown C., 1981. A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a long island hatchery during a recent outbreak of disease *J. Shellfish Res.* 1, 83-87.
- Brown C., Losee E., 1978. Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 31, 41-47.
- Brown C., Tettelbach L. P., 1988. Characterisation of a nonmotile *Vibrio sp.* pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 74, 195-204.

- Brown D. C., Bradley B. P., Paynter K. T., 1993. The physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Induction of stress proteins. *J. Shellfish. Res.* 12, 135-136.
- Bulet P., Stocklin R., Menin L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169-184.
- Bulgakov A. A., Park K. I., Choi K. S., Lim H. K., Cho M., 2004. Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 487-499.
- Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Techniq.* 57, 469-476.
- Carballal M. J., Lopez C., Azevedo C., Villalba A., 1997a. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invert. Path.* 70, 96-105.
- Carballal M. J., Lopez C., Azevedo C., Villalba A., 1997b. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 403-416.
- Carlsson A., Nyström T., De Cock H., Bennich H., 1998. Attacin an insect immune protein-binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer membrane protein synthesis. *Microbiol. Engl. Tr.* 144, 2179-2188.
- Cellura C., Toubiana M., Parrinello N., Roch P., 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 340-350.
- Cerenius L., Söderhäll K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 421-437.
- Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hetru C., Hoffmann J. A., Bulet P., 1996. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 271, 21808-21813.
- Chu F.-L., Webb K. L., 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids* 19, 815-820.

- Chuchalin A. G., Novoselov V. I., Shifrina O. N., Soodaeva S. K., Yanin V. A., Barishnikova L. M., 2003. Peroxiredoxin VI in human respiratory system. *Respir. Med.* 97, 147-151.
- Cooper D. N. W., Barondes S. H., 1999. God must love galectins; He made so many of them. *Glycobiology* 9, 979-984.
- Coutteau P., Caers M., Mallet L. A., Moore W., Manzi J., Sorgeloos P., 1994. Effect of lipid supplementation on growth, survival and fatty acid composition of bivalve larvae (*Ostrea edulis* L. and *Mercenaria mercenaria* L.), in: P. Kestemont, J. Muir, F. Sevilla, P. Williot (Eds.), *Aquaculture '94*. CEMAGREF, Bordeaux, 213-218.
- Crosby M. P., Newell R. I. E., Langdon J., 1990. Bacterial mediation in the utilization of carbon and nitrogen from detrital complexes by *Crassostrea virginica*. *Limnol. Oceanogr* 35, 625-639.
- Cunningham C., Hikima J. I., Jenny M. J., Chapman R. W., Fang G. C., Sasaki C., Lundqvist M. L., Wing R. A., Cupit P. M., Gross P. S., Warr G. W., Tomkins J. P., 2006. New resources for marine genomics: Bacterial artificial chromosome libraries for the eastern and pacific oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*). *Mar. Biotechnol.* 8, 521-533.
- Dahms H.-U., Dobretsov S., Qian P.-Y., 2004. The effect of bacterial and diatom biofilms on the settlement of the bryozoan *Bugula neritina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 313, 191-209.
- Dandapat J., Chainy G. B. N., Rao K. J., 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 135, 221-233.
- Daugaard M., Rohde M., Jaattela M., 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 581, 3702-3710.
- David E., Tanguy A., Pichavant K., Moraga D., 2005a. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal* 272, 5635-5652.
- David E., Tanguy A., Pichavant K., Moraga D., 2005b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal* 272, 5635-5652.

- Davies K., 1995 Oxidative stress: the paradox of aerobic life Bioch. Soc. Symposium 61, 1-31.
- Deane E. E., Li J., Woo Y. S., 2004. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. Dis. Aquat. Org. 62, 205-215.
- Deaton L. E., Jordan P. J., Dankert J. R., 1999. Phenoloxidase activity in the hemolymph of bivalve mollusks. J. Shellfish Res. 18, 223-226.
- Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 15, 316-328.
- Delaporte M., Soudant P., Moal J., Giudicelli E., Lambert C., Seguineau C., Samain J. F., 2006. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Lipids 41, 567-576.
- Delaporte M., Soudant P., Moal J., Lambert C., Quéré C., Miner P., Choquet G., Paillard C., Samain J.-F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species-*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. J. Exp. Biol 206, 3053-3064.
- Delaunay F., Marty Y., Moal J., Samain J.-F., 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 163, 209-219.
- Delaunay F., Marty Y., Moal J., Samain J.-F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 173, 163-179.
- Di-Salvo L. H., Blecka J., Zebal R., 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. AEM 35, 219-221.
- Douillet P., 1993a. Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser 98, 123-134.
- Douillet P. A., 1993b. Carbon contribution through bacterivory in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea Gigas*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 102, 303-314.

- Douillet P., Langdon C. J., 1994. Effects of marine-bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea Gigas* (Thunberg) Larvae. Biol. Bull. 184, 36-51.
- Dyrynda E. A., Pipe R. K., Ratcliffe N. A., 1995. Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae. Fish Shellfish Immunol. 5, 569-580.
- Elston R., Leibovitz L., 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 964-978.
- Elston R., Leibovitz L., Relyea D., Zatlila J., 1981. Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: diagnostic and management features. Aquaculture 24, 53-62.
- Elston R. A., 1980a. Functional anatomy, histology and ultrastructure of soft tissues of the larval American oyster *Crassostrea virginica*. Proc. Natl. Shellfish Assoc. 70, 65-93.
- Elston R. A., 1980b. Functional morphology of the coelomocytes of the larval oysters *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 60, 947-957.
- Elston R. A., 1999. Health Management, development and Histology of Seed Oysters. World Aquaculture Society Baton Rouge, Louisiana, USA., 110 pp.
- Escoubas J. M., Briant L., Montagnani C., Hez S., Devaux C., Roch P., 1999. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. Febs Letters 453, 293-298.
- Estes R. M., Friedman C. S., Elston R. A., Herwig R. P., 2004. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. Dis. Aquat. Org. 58, 223-230.
- Exton, J. H., 2002. Regulation of phospholipase D. FEBS Lett. 531, 58-61.
- Farias A., Bell J. G., Uriarte I., Sargent J. R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. Aquaculture 228, 289-305.
- Farias A., Uriarte I., Castilla J. C., 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. Aquaculture 166, 37-47.

- Fitt W. K., Coon S. L., Walch M., Weiner R. M., Colwell R. R., Bonar D. B., 1990. Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. *Mar. Biol.* 106, 389–394.
- Fitt W. K., Labare M. P., Fuqua W. C., Walch M., Coon S. L., Bonar D. B., Colwell R. R., Weiner R. M., 1989. Factors influencing bacterial production of inducers of settlement behavior of larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* 17, 287-298.
- Fleury E., Huvet A., Lelong C., de Lorgeril J., Boulo V., Gueguen Y., Bachere E., Tanguy A., Moraga D., Fabioux C., Lindeque P., Shaw J., Reinhardt R., Prunet P., Davey G., Lapegue S., Sauvage C., Corporeau C., Moal J., Gavory F., Wincker P., Moreews F., Klopp C., Mathieu M., Boudry P., Favrel P., 2009. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* 10, 341-355.
- Flye-Sainte-Marie J., Pouvreau S., Paillard C., Jean F., 2007. Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 349, 378-389.
- Fraser A. J., 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. *J. Fish. Res. Board Can.* 46, 1868-1873.
- Frlan, R. and Gobec, S. (2006) Inhibitors of Cathepsin B. *Current Medicinal Chemistry.* 13: 2309-2327.
- Fujita T., Matsushita M., Endo Y., 2004. The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* 198, 185-202.
- Gallager S. M., Mann R., Sasaki G. C., 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56, 81-103.
- García-Esquivel Z., Bricelj V. M., Felbeck H., 2002. Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 63-77.
- García-Esquivel Z., Bricelj V. M., González-Gómez M. A., 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263, 77-103.

- Garland C.D., Nash G.V., Sumner C.E., McMeekin A.M., 1983, Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 34, 483-487.
- Gauthier J. D., Vasta G. R., 1994. Inhibition Of In-Vitro Replication Of The Oyster Parasite *Perkinsus-Marinus* By The Natural Iron Chelators Transferrin, Lactoferrin, And Desferrioxamine. Dev. Comp. Immunol. 18, 277-286.
- Gestal C., Roch P., Renault T., Pallavicini A., Paillard C., Novoa B., Oubella R., Venier P., Figueras A., 2008. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. Rev. Fish. 16, 133-156.
- Gonzalez M., Gueguen Y., Desserre G., de Lorgeril J., Romestand B., Bachere E., 2007a. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. 31, 332-339.
- Gonzalez M., Gueguen Y., Destoumieux-Garzon D., Romestand B., Fievet J., Pugnieri M., Roquet F., Escoubas J. M., Vandenbulcke F., Levy O., Saune L., Bulet P., Bachere E., 2007b. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. Proc. Ntl. Acad. Sc. U.S. 104, 17759-17764.
- Gonzalez M., Romestand B., Fievet J., Huvet A., Lebart M. C., Gueguen Y., Bachere E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 1089-1097.
- Greger E. A., Drum A. S., Elston R. A., 1995. Measurement of oxidative activity in hemocytes of the pacific razor clam, *Siliqua patula*, and the oyster, *Crassostrea gigas*, using lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence. J. Inv. Pathology 65, 48-60.
- Gueguen Y., Cadoret J. P., Flament D., Barreau-Roumiguere C., Girardot A. L., Garnier J., Hoareau A., Bachere E., Escoubas J. M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. Gene 303, 139-145.
- Gueguen Y., Herpin A., Aumelas A., Garnier J., Fievet J., Escoubas J. M., Bulet P., Gonzalez M., Lelong C., Favrel P., Bachere E., 2006. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas* - Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. J. Biol. Chem. 281, 313-323.

- Gueguen Y., Romestand B., Fievet J., Schmitt P., Destoumieux-Garzon D., Vandebulcke F., Bulet P., Bachere E., 2009. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Mol. Immunol.* 46, 516-522.
- Guillard R. R. L., 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *Biol. Bull.* 117, 258-266.
- Gullian M., Thompson F., Rodriguez J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1-14.
- Guo S. H., Wharton W., Moseley P., Shi H. L., 2007. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones* 12, 245-254.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem. Biophys.* 246, 501-514.
- Harris E. D., 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 2675-2683.
- Hazel J. R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19-42.
- Hegaret H., Wikfors G. H., Soudant P., Delaporte M., Alix J. H., Smith B. C., Dixon M. S., Quere C., Le Coz J. R., Paillard C., 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* 234, 541-560.
- Hibbetts, K., Hines, B. and Williams, D., 1999. An overview of proteinase inhibitors. *J Vet Intern Med.* 13, 302-308.
- Hine, P.M., Wesney, B. and Hay, B.E., 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 12, 135-142.
- Hine P. M., Wesney B., 1994. The functional cytology of *Bonamia* sp. (*Haplosporidia*) infecting oysters *Triostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.* 20, 219-229

- His E., Maurer D., 1988. Shell growth and gross biochemical composition of oyster larvae *Crassostrea gigas* in the field. *Aquaculture* 69, 185–194.
- Hoffmann J. A., Reichhart J. M., 2002. *Drosophila* innate immunity: An evolutionary perspective. *Nature Immunology* 3, 121-126.
- Holland D. L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. Malin DC, Sargent JR (eds) *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. Academic Press, London., 85–123.
- Holland D. L., Spencer B. E., 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 53, 287-298.
- Howard R., Stanley D., 1999. The tie that binds: eicosanoids in invertebrate biology. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92, 880-890.
- Huang L., Mivechi N. F., Moskophidis D., 2001. Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: Analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8575-8591.
- Huang S. Y., Hadfield M. G., 2003. Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260, 161-172.
- Hubert F., Noel T., Roch P., 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* 240, 302-306.
- Hulbert A. J., Else P. L., 1999. Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J. Theor. Biol.* 199, 257-274.
- Humphries J. E., Yoshino T. P., 2003. Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: Connections with the innate immune system of vertebrates. *Int. Comp. Biol.* 43, 305-312.
- Hurtado M. A., Reza M., Ibarra A. M., Wille M., Sorgeloos P., Soudant P., Palacios E., 2009. Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E-2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture* 294, 300-305.

- Huvet A., Herpin A., Degremont L., Labreuche Y., Samain J. F., Cunningham C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211-220.
- Iijima R., Kisugi J., Yamazaki M., 2003. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 305-311.
- Iwanaga S., Lee B. L., 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 128-150.
- Jeffries V. E., 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 1982, 201-226.
- Jenny M. J., Chapman R. W., Mancina A., Chen Y. A., McKillen D. J., Trent H., Lang P., Escoubas J. M., Bachere E., Boulo V., Liu Z. J., Gross P. S., Cunningham C., Cupit P. M., Tanguy A., Guo X., Moraga D., Boutet I., Huvet A., De Guise S., Almeida J. S., Warr G. W., 2007. A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Mar. Biotechnol.* 9, 577-591.
- Jenny M. J., Ringwood A. H., Lacy E. R., Lewitus A. J., Kempton J. W., Gross P. S., Warr G. W., Chapman R. W., 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* 4, 81-93.
- Jenny M. J., Warr G. W., Ringwood A. H., Baltzegar D. A., Chapman R. W., 2006. Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): Ontogeny and differential expression in response to different stressors. *Gene* 379, 156-165.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E. W., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491-512.
- Jonsson P. R., Berntsson K. M., Andre C., Wangberg S. A., 1999. Larval growth and settlement of the European oyster (*Ostrea edulis*) as a function of food quality measured as fatty acid composition. *Mar. Biol.* 134, 559-570.
- Kanost M. R., 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 291-301.

- Kennedy V.S., Newell R.I.E., Eble, A.F. (eds.), 1996. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. College Park, Maryland, USA, Maryland Sea Grant College Publication UM-SG-TS-96-01.
- Klingensmith J. S., 1982. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids* 17, 976-981.
- Kohen R., Nyska A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620-650.
- Koutsogiannaki S., Kaloyianni M., 2010. Signaling molecules involved in immune responses in mussels. *Inv. Surv. J.* 7, 11-21.
- Kraffe E., Soudant P., Marty Y., 2004. Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids* 39, 59-66.
- Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspect. Med.* 27, 95-125.
- Kumar R. S., Sivakumar T., Sunderam R. S., Gupta M., Mazumdar U. K., Gomathi P., Rajeshwar Y., Saravanan S., Kumar M. S., Muruges K., Kumar K. A., 2005. Antioxidant and antimicrobial activities of *B. racemosa* L. stem bark. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38, 1015-1024.
- Labarta U., Fernandez-Reiriz M. J., Perez-Camacho A., 1999. Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 238, 225-242.
- Labreuche Y., Lambert C., Soudant P., Boulo V., Huvet A., Nicolas J. L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infect.* 8, 2715-2724.
- Lacoste A., De Cian M.-C., Cueff A., Poulet S. A., 2001. Noradrenaline and α -adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *J. Cell. Sci.* 114, 3557-3564.

- Lambert C., J.-L. Nicolas and V. Bultel, 2001. Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract. *J. Inv. Pathol.* 77, 165-172.
- Lambert C., Nicolas J. L., 1998. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic *Vibrios* in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *J. Inv. Pathol.* 71, 53-63.
- Lambert C., Nicolas J. L., Cilia V., Corre S., 1999. *Vibrio pectenocida* sp. nov. a pathogen of *Pecten maximus* larvae, in: O.E. Strand (Eds.), 12. Int. Pectinid Workshop, Bergen, Norway.
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 225-240.
- Lambert C., Soudant P., Degremont L., Delaporte M., Moal J., Boudry P., Jean F., Huvet A., Samain J. F., 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* 270, 276-288.
- Langdon C. J., Waldock M. J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 61, 431-448.
- Le Gall G., Bachère E., Mialhe E., 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific rickettsiales-like organisms. *Dis. Aquat. Org.* 11, 181-186.
- Leibovitz L., 1989. Chlamydiosis - A newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops, *Argopecten-Irradians* (Lamarck). *J. Fish Dis.* 12, 125-136.
- Leppa S., Bohmann D., 1999. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* 18, 6158-6162.
- Levy B. D., Clish C. B., Schmidt B., Gronert K., Serhan C. N., 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* 2, 612-619.

- Levy O., 2000. A Neutrophil-Derived Anti-Infective Molecule: Bactericidal/Permeability-Increasing protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2925-2931.
- Lindquist S., Craig E. A., 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- Lodeiros C., Bolinches J., Dopazo C. P., Toranzo A. E., 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65, 15-29.
- Lopez C., Carballal M. J., Azevedo C., Villalba A., 1997. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (*Mollusca:bivalvia*). *Fish Shellfish Immunol.* 7, 595-608.
- Lopez C., Carballal M. J., Bachère E., 1994. Absence of generation of active oxygen radicals by the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (*Mollusca: bivalvia*) coupled with phagocytosis. *J. Inv. Patholgy* 64, 188-192.
- Lu Y. T., Blake N. J., Torres J. J., 1999. Biochemical utilization during embryogenesis and metamorphosis in the Bay scallop, *Argopecten Irradians Concentricus* (Say). *J. Shellfish Res.* 18, 425-429.
- Luna-González A., A. N. Maeda-Martínez, J. C. Sainz, F. Ascencio-Valle, 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis. Aquat. Org.* 49, 221-226.
- Luna-Gonzalez A., Maeda-Martinez A. N., Ascencio-Valle F., Robles-Mungaray M., 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 287-294.
- Luna-Gonzalez A., Maeda-Martinez A. N., Vargas-Albores F., Ascencio-Valle F., Robles-Mungaray M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 275-282.
- Madon S. P., Schneider D. W., Stoeckel J. A., 1998. In situ estimation of zebra mussel metabolic rates using the electron transport system (ETS) assay. *J. Shellfish Res.* 17, 195-203.
- Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulenger F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs: A review. *ISJ* 2, 91-104.

- Manevich Y., Shuvaeva T., Dodia C., Kazi A., Feinstein S. I., Fisher A. B., 2009. Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 139-149.
- Margis R., Dunand C., Teixeira F. K., Margis-Pinheiro M., 2008. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs Journal* 275, 3959-3970.
- Martin G. G., Poole D., Poole C., Hose J. E., Arias M., Reynolds L., McKrell N., Whang A., 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 308-315.
- Meyer E., Green A. J., Moore M., Manahan D. T., 2007. Food availability and physiological state of sea urchin larvae (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Mar. Biol.* 152, 179-191.
- Milke L. M., Bricelj V. M., Parrish C. C., 2004. Enhanced production of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on binary microalgal diets, with emphasis on lipids and polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* 234, 293-317.
- Mitta G., Hubert F., Dzyrynda E. A., Boudry P., Roch P., 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 381-393.
- Monari M., Matozzo V., Foschi J., Marin M. G., Cattani O., 2005. Exposure to anoxia of the clam, *Chamelea gallina* II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 325, 175-188.
- Montagnani C., Le Roux F., Berthe F., Escoubas J. M., 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *Febs Letters* 500, 64-70.
- Montagnani C., Kappler C., Reichhart J. M., Escoubas J. M., 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappa B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Febs Letters* 561, 75-82.
- Montagnani C., Tirape A., Boulo V., Escoubas J. M., 2005. The two Cg-timp mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 831-839.

- Montagnani C., Avarre J. C., de Lorgeril J., Quiquand M., Boulo V., Escoubas J. M., 2007. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 1-11.
- Montagnani C., Labreuche Y., Escoubas J. M., 2008. Cg-I kappa B, a new member of the I kappa B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 182-190.
- Moore, C. and Gelder, S. (1985) Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Trans. Am. Micros. Soc.* 104: 242-249.
- Moran A. L., Manahan D. T., 2003. Energy metabolism during larval development of green and white abalone, *Haliotis fulgens* and *H. sorenseni*. *Biol. Bull.* 204, 270-277.
- Moran A. L., Manahan D. T., 2004. Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 306, 17-36.
- Nagase H., Woessner J. F., 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491-21494.
- Nakayama K., Maruyama T., 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 151-159.
- Nevejan N., Saez I., Gajardo G., Sorgeloos P., 2003a. Energy vs. essential fatty acids: what do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most? *Comp. Biochem. Physiol.* 134B, 599-613.
- Nevejan N., Saez I., Gajardo G., Sorgeloos P., 2003b. Supplementation of EPA and DHA emulsions to a *Dunaliella tertiolecta* diet: effect on growth and lipid composition of scallop larvae, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 217, 613-632.
- Nicolas J. L., Ansquer D., Cochard J. C., 1992. Isolation and characterisation of a pathogenic bacterium specific to manila clam *Tapes philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 14, 153-159.
- Nicolas J. L., Corre S., Cochard J. C., 2004. Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. *Microb. Ecol.* 48, 400-413.

- Nicolas J. L., Corre S., Gauthier G., Robert R., Ansquer D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27, 67-76.
- Olafsen J. A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223-247.
- Olafsen J. A., Fletcher T. C., Grant P. T., 1992. Agglutinin activity in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio-Anguillarum* Challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 123-138.
- Olivier F., Tremblay R., Bourget E., Rittschof D., 2000. Barnacle settlement: field experiments on the influence of larval supply, tidal level, biofilm quality and age of *Balanus amphitrite* (Darwin) cyprids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 199, 185-204.
- Osada M., Nishikawa M., Nomura T., 1989. Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Bioch. Physiol. C.* 94, 595-601.
- Ottaviani E., 2006. Review. Molluscan immunorecognition. *Inv. Surv. J.* 3, 50-63.
- Oubella R., Maes P., Paillard C., Auffret M., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (*Mollusca, Bivalvia*). *Dis. Aquat. Org.* 15, 193-197.
- Paillard C., Le Roux F., Borrego J. J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17, 477-498.
- Pernet F., Bricelj V. M., Parrish C. C., 2005. Effect of varying dietary levels of omega 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327, 115-133.
- Pernet F., Tremblay R., 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310, 73- 86.
- Pernet F., Tremblay R., Bourget E., 2003. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part I: Broodstock conditioning and young larvae performance. *J. Shell. Res.* 22, 365-376.

- Pernet F., Tremblay R., Langdon C., Bourget E., 2004. Effect of additions of dietary triglyceride microspheres on growth, survival and settlement of mussel (*Mytilus sp.*) larvae. *Mar. Biol.* 144, 693-703.
- Pipe R. K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussels *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 22, 595-603.
- Pipe R. K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 111-122.
- Pirini M., Manuzzi M. P., Pagliarani A., Trombetti F., Borgatti A. R., Ventrella V., 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comp. Biochem. Physiol. B* 147, 616-626.
- Porcher C., Swat W., Rockwell K., Fujiwara Y., Alt F. W., Orkin S. H., 1996. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57.
- Qian P., 2003. Relationship between bacterial community profile in biofilm and attachment of the acorn barnacle *Balanus amphitrite*. *Aquat. Microb. Ecol.* 33, 225-237.
- Quilang J., Wang S. L., Li P., Abernathy J., Peatman E., Wang Y. P., Wang L. L., Shi Y. H., Wallace R., Guo X. M., Liu Z. J., 2007. Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers. *Bmc Genomics* 8, 157-167.
- Rabinovich G. A., Gruppi A., 2005. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol.* 27, 103-114.
- Renault T., Le Deuff R. M., Cochenec N., Chollet B., Maffart P., 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Veter. Res.* 26, 539-543.
- Renwrantz L., Stahmer A., 1986. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol. B* 149, 535-546.

- Rico-Villa B., Le Coz J. R., Mingant C., Robert R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 377-388.
- Riquelme, Hayashida, Vergara, Vasquez, Morales Y., Chavez P., 1995a. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture* 138, 49-60.
- Riquelme C., Hayashida G., Toranzo A. E., Vilches J., Chavez P., 1995b. Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis. Aquat. Org.* 22, 135-141.
- Robert R., Miner P., Nicolas J. L., 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquacult. Int.* 4, 305-313.
- Rodriguez J. L., Sedano F. J., Garcia-Martin L. O., Perez-Camacho A., Sanchez J. L., 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. *Mar. Biol.* 106, 109-111.
- Rowley A. F., Vogan C. L., Taylor G. W., Clare A. S., 2005. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J. Exp. Biol.* 208, 3-14.
- Ruggeri B., Thoroughgood C. A., 1985. Prostaglandins in aquatic fauna: a comprehensive review. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23, 301-306.
- Ruiz-Ponte C., Samain J. F., Sánchez J. L., Nicolas J. L., 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Mar. Biotechnol.* 1, 52-59.
- Saintsing D. G., Hwang D. H., Dietz T. H., 1983. Production of prostaglandins E₂ and F₂ alpha in the freshwater mussel *Ligumia subrostrata*: relation to sodium transport. *Pharmacology* 226, 455-461.
- Sainz J. C., A.N. Maeda-Martinez and F. Ascencio, 1998. Experimental Vibriosis Induction with *Vibrio alginolyticus* of Larvae of the Catarina Scallop (*Argopecten ventricosus* = *circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb. Ecol.* 188-192.
- Samain J. F., Dégremont L., Soletchnik P., Haure J., Bédier E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt H., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert S., Boulo V., Soudant P., Nicolas J. L., Le Roux F., Renault T., Gagnaire B., Gereth F., Boutet I., Burgeot T., Boudry P., 2007. Genetically based resistance to summer

- mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227-243.
- Sasamura T., Kobayashi T., Kojima S., Qadota H., Ohya Y., Masai I., Hotta Y., 1997. Molecular cloning and characterization of *Drosophila* genes encoding small GTPases of the rab and rho families. *Mol. Gen. Genet.* 254, 486-494.
- Sato S., Ouellet N., Pelletier I., Simard M., Rancourt A., Bergeron M. G., 2002. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J. Immunol.* 168, 1813-1822.
- Scotti P. D., Dearing S. C., Greenwood D. R., Newcomb R. D., 2001. Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (*Bivalvia* : *Mytilidae*). *Comp. Bioch. Physiol. B* 128, 767-779.
- Seguineau C., Lashi-Loquerie A., Moal J., Samain J.-F., 1996. Vitamin requirements in great scallop larvae. *Aqua. Int.* 4, 315-324.
- Seguineau C., Migaud H., Quere C., Moal J., Samain J.-F., 2001. Changes in tissue concentrations of the vitamins B1 and B2 during reproductive cycle of bivalves: Part 2. The Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 196, 139-150.
- Seguineau C., Racotta I. S., Palacios E., Delaporte M., Moal J., Soudant P., 2011. The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 160, 87-93.
- Seo J. K., Crawford J. M., Stone K. L., Noga E. J., 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1998-2004.
- Sethu, S., Pushparaj, P. N., Melendez, A. J., 2010. Phospholipase D1 Mediates TNF alpha-Induced Inflammation in a Murine Model of TNF alpha-Induced Peritonitis. *Plos One* 5.
- Shai Y., 2000. Functional domains within fusion proteins: Prospectives for development of peptide inhibitors of viral cell fusion. *Biosci. Rep.* 20, 535-555.

- Sharon N., Lis H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiol.* 14, 53R-62R.
- Shrestha, S., Kim, Y., 2010. Activation of immune-associated phospholipase A(2) is functionally linked to Toll/Imd signal pathways in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 530-537.
- Shivdasani R. A., Mayer E. L., Orkin S. H., 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.
- Shuvaeva T. M., Novoselov V. I., Fesenko E. E., Lipkin V. M., 2009. Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 35, 523-537.
- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., et al (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 276: 33293-33296.
- Soderhall K., Cerenius L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opinion Immunol.* 10, 23-28.
- Song L. S., Wu L. T., Ni D. J., Chang Y. Q., Xu W., Xing K. Z., 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 335-345.
- Soudant P., Marty Y., Moal J., Masski H., Samain J. F., 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 121, 279-288.
- Stanley D., Miller J., Tunaz H., 2009. Eicosanoid Actions in Insect Immunity. *J. Innate Immun.* 1, 282-290.
- Stanley D. W., Howard R. W., 1998. The biology of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates: Cellular, organismal and ecological actions. *Am. Zool.* 38, 369-381.
- Stanley D. W., Miller J. S., 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119, 1-13.

- Sugumar G., Nakai T., Hirata Y., Matsubara D., Muroga K., 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 33, 111-118.
- Sutton D. C., Garrick R., 1993. Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 16, 47-53.
- Tanji T., Hu X. D., Weber A. N. R., Ip Y. T., 2007. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4578-4588.
- Tanji T., Yun E.-Y., Ip Y. T., 2010. Heterodimers of NF-kappa B transcription factors DIF and Relish regulate antimicrobial peptide genes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14715-14720.
- Takahashi K. G., Nakamura A., Mori K., 2000. Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 212-217.
- Tanguy A., Bierne N., Saavedra C., Pina B., Bachere E., Kube M., Bazin E., Bonhomme F., Boudry P., Boulo V., Boutet I., Cancela L., Dossat C., Favrel P., Huvet A., Jarque S., Jollivet D., Klages S., Lapegue S., Leite R., Moal J., Moraga D., Reinhardt R., Samain J. F., Zouros E., Canario A., 2008. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* 408, 27-36.
- Tanguy A., Boutet I., Bonhomme F. Y., Boudry P., Moraga D., 2002. Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. *Biomarkers* 7, 439-450.
- Tanguy A., Boutet I., Riso R., Boudry P., Auffret M., Moraga D., 2003. Metallothionein genes in the European flat oyster *Ostrea edulis*: A potential ecological tool for environmental monitoring? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257, 87-97.
- Tanguy A., Guo X. M., Ford S. E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338, 121-131.
- Tanguy A., Moraga D., 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene* 273, 123-130.

- Tanguy A., Mura C., Moraga D., 2001. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat. Toxicol.* 55, 35-47.
- Teh C., Le Y., Lee S., Lu J., 2000. M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl- d-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunology* 101, 225-232.
- Thomas-Guyon H., Gagnaire B., Bado-Nilles A., Bouilly K., Lapegue S., Renault T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev. Comp. Immunol.* 33, 653-659.
- Thompson P. A., Guo M., Harrison P. J., 1994. Influence of irradiance on the nutritional value of two phytoplankton species fed to larval Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*). *Mar. Biol.* 119, 89-97.
- Tirapé A., 2007. Contribution à l'étude de l'ontogenèse du système immunitaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II, 194p.
- Tirapé A., Bacque C., Brizard R., Vandembulcke F., Boulo V., 2007. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 859-873.
- Torreilles, J., Guerin, M. and Roch, P. (1997) Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 267-275.
- Torkildsen L., Lambert C., Nylund A., Magnesen T., Bergh O., 2005. Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival. *Aquacul. Inter.* 13, 575-592.
- Tripp M. R., 1966. Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*. *J. Invert. Pathol.* 8, 478-484.
- Tritar S., Prieur D., Weiner R., 1992. Effect of bacterial films on the settlement of the oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Ostrea edulis*, (Linnaeus, 1750) and the scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.* 11, 325-330.

- Tubiash H. S., Chanley P. E., Leifson E., 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.* 90, 1036-1044.
- Tubiash H. S., Colwell R. R., Sakazaki R., 1970. Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bact.* 103, 272-273.
- Tunaz H., Park Y., Buyukguzel K., Bedick J. C., Aliza A. R. N., Stanley D. W., 2003. Eicosanoids in insect immunity: Bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A(2) activity in tobacco hornworms. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 52, 1-6.
- Ursini F., Maiorino M., Gregolin C., 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Bioch. Biophys. Acta* 839, 62-70.
- Uvell H., Engstrom Y., 2007. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet.* 23, 342-349.
- Vasta G. R., Ahmed H., Fink N. E., Elola M. T., Marsh A. G., Snowden A., Odom E. W., 1994. Animal lectins as self/non-self recognition molecules - biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution, in: G. Beck, E.L. Cooper, G.S. Habicht, J.J. Marchalonis (Eds.), *Primordial Immunity: Foundations for the Vertebrate Immune System*, 55-73.
- Ventrella V., Pirini M., Pagliarani A., Trombetti F., Manuzzi M. P., Borgatti A. R., 2008. Effect of temporal and geographical factors on fatty acid composition of *M. galloprovincialis* from the Adriatic sea. *Comp. Biochem. Physiol. B* 149, 241-250.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655-671.
- Videla J. A., Chaparro O. R., Thompson R. J., Concha I. I., 1998a. Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis and early juvenile development of the oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Biol.* 132, 635-640.
- Videla J. A., Chaparro O. R., Thompson R. J., Concha I. I., 1998b. Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis and early juvenile development of the oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Biol.* 132, 635-640.
- Voet D., Voet J. G., 1998. *Biochimie*, seconde édition. De boeck Université Bruxelles, Belgique.

- Waldock M. J., Holland D. L., 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 19, 332–336.
- Waldock M. J., Nascimento I. A., 1979. The triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different diets. *Mar. Biol. Lett.* 1, 77–86.
- Whyte J. N. C., Bourne N., Ginther N. G., 1990. Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.* 106, 239–244.
- Whyte J. N. C., Bourne N., Ginther N. G., Hodgson C. A., 1992. Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantea* (Gray). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 13–29.
- Whyte J. N. C., Bourne N., Hodgson C. A., 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113, 113–124.
- Whyte J. N. C., Bourne N., Hodgson C. A., 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture* 78, 333–348.
- Xue Q. G., Renault T., 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *J. Inv. Pathology* 76, 155–163.
- Yonge C. M., 1926. Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 14, 295–386.

