

Variabilité de la capacité de résistance des populations de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* face à *Vibrio harveyi*

Bruno Dubief

► To cite this version:

Bruno Dubief. Variabilité de la capacité de résistance des populations de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* face à *Vibrio harveyi*. Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. <NNT : 2017BRES0020>. <tel-01694393>

HAL Id: tel-01694393

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01694393>

Submitted on 27 Jan 2018

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

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



université de bretagne
occidentale

UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Bruno Dubief

Préparée à l'Institut Universitaire Européen
de la Mer, Laboratoire des Sciences de
l'Environnement Marin

Thèse soutenue le 24 Février 2017

devant le jury composé de :

Stéphanie AUZOUX-BORDENAVE

Maitre de conférences, Sorbonne Universités / *rapporteur*

Erwan CORRE

Ingénieur de recherche, Station Biologique de Roscoff /
examineur

Abdelaziz HEDDI

Professeur, Département of Biosciences, INSA Lyon / *rapporteur*

Flavia NUNES

Chercheur, Ifremer Centre Bretagne / *co-encadrante de thèse*

Christine PAILLARD

Directrice de recherche, CNRS, IUEM-UBO / *directrice de thèse*

Vianney PICHEREAU

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *examineur*

Olivier BASUYAUX

Docteur, Synergie Mer et Littoral / *Membre invité*

Variabilité de la capacité de résistance des populations de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* face à *Vibrio harveyi*

Remerciements

Je souhaite remercier l'université de Bretagne Occidentale ainsi que le labex Mer qui ont financé ma thèse.

Je tiens à remercier Stéphanie Auzoux-Bordenave et Abdelaziz Heddi qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je tiens aussi à remercier Erwan Corre et Vianney Pichereau pour avoir accepté d'être jury en tant qu'examinateur.

Je tiens aussi à remercier mes deux superbes encadrantes Flavia Nunes et Christine Paillard. Je m'estime chanceux d'avoir pu effectuer ma thèse avec des personnes telles que vous !

Une mention toute particulière pour Olivier Basuyaux sans qui les deux expérimentations sur lesquels sont fondés ma thèse n'auraient pas été possibles. Merci à Naïda Laisney et Stephanie Petinay qui ont participé à ces manips, mais aussi à l'ensemble de l'équipe du SMEL qui m'ont accueilli avec beaucoup de chaleur et dont l'ambiance a rendu ces périodes stressante et fastidieuse bien plus agréable.

Toujours concernant ces fameuses infections expérimentales, je tiens à remercier Fabien Riera, qui a grandement aidé aux nombreuses dissections nécessaires à ces manips, mais aussi Gaëlle Richard et Ewan Harney qui ont accepté de prendre plus de deux jours de leur temps pour venir en Normandie pour faire des journées de 15h non-stop, et ce, avec le sourire. Sans vous, je ne vois pas trop comment j'aurai pu réaliser tout le travail en respectant les temps de prélèvement de ma manip, et votre bonne humeur dans ces moments hyper stressant a été plus que bien venue.

Je remercie aussi Adeline Bidault pour ces conseils en qPCR et les coups de mains qu'elle m'a donné.

Et bien-sûr, une pensée pour l'ensemble des collègues thésards du bureau A107, passé et présent pour ces bons moments passés à discuter, délirer : Maloche, Nono, Gaël, Laura, Emilien, Marc, Kevin. Pour des bon moments dont certains quelques peu improbables, comme discuter d'une solution technique pour permettre aux astronautes de déféquer en toute tranquillité dans leur combinaison spatiale (Emilien, je suis sûre qu'on aurait pu avoir le prix de la Nasa si on s'y était mis sérieusement 😊), ou d'autre moment à s'indigner de l'attitude de nos politiques, ou encore à délirer sur des blagues qui ne rendent franchement pas justice à notre intelligence qui j'en suis convaincu, se trouve là ... quelque part ... dans un

recoin de nos cerveaux ! Plus sérieusement, dans les moments un peu difficiles de la thèse, tous ces collègues à l'humour douteux ont été d'un vrai soutien !

Je n'oublie bien sûr pas les autres collègues de l'IUEM avec qui j'ai passé de super moments, Margot, Gaëlle, Elodie, les discussions pour refaire le monde et rallonger les pauses avec Adèle. Et une mention spéciale à Floriane qui m'a énormément aidé pour la mise en page de ce manuscrit.

Et enfin, un grand merci à ma chérie, qui m'a supporté et encouragé dans les moments les plus difficiles de cette thèse, qui m'a consolé dans ces longues périodes où rien ne fonctionne et qui a supporté mon absence dans les derniers mois de rédaction de ce manuscrit.

Sommaire

Introduction	13
Introduction générale.....	16
Objectifs	37
 Chapitre 1 Résistance, mémoire immunitaire et voie d'entrée de <i>V. harveyi</i> chez l'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i>.....	39
Introduction de l'article	41
Article.....	43
 Chapitre 2 Analyse transcriptomique de la résistance.....	69
Introduction de l'article	71
Article.....	75
 Chapitre 3 La méthylation de l'ADN chez <i>Haliotis tuberculata</i>...	105
Introduction de l'article	107
Article.....	109
 Discussion	129
Résistance.....	132
Les branchies, voie d'entrée de la bactérie, ou barrière infranchissable ...	138
L'effet de priming immunitaire chez <i>Haliotis tuberculata</i>	139
L'épigénétique chez l'ormeau	141
 Références	145

Liste des Figures hors article

Figure 1 : Carte de Bretagne indiquant, les zones où des mortalités ont été observées *in situ*, et les isothermes de température estivale maximum de l'eau en été. **19**

Figure 2 : Anatomie de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* **20**

Figure 3 : (A) Températures estivales moyennes de l'eau à Flammanville (Normandie) et (B) influence de la température sur la mortalité d'ormeaux matures exposés à *V. harveyi*. **21**

Figure 4 : Evolution des paramètres immunitaires d'*Haliotis tuberculata* pendant la gamétogenèse. **22**

Figure 5 : Développement larvaire de l'ormeau *Haliotis tuberculata* **24**

Figure 6 : Schéma hypothétique des différentes étapes du processus de phagocytose. **26**

Figure 7 : A : observation microscopique des branchies d'ormeaux immédiatement après une mise en contact avec la souche ORM4 de *V. harveyi* exprimant la GFP (Gren fluorescente protein). B : Densité de *V. harveyi* ayant adhéré ou pénétré dans les différents organes de l'ormeau durant une exposition. C : cycle infectieux de *V. harveyi* chez l'ormeau. **27**

Figure 8 : Influence de la 5-aza-cytidine sur des embryons d'huître *C. gigas* à 6 et 24 heures post-fertilisation. **31**

Figure 9 : Localisation des populations utilisées pour cette expérimentation : M = Molène ; S = Saint-Malo et B = Bretteville. La carte de température est issu du site internet de modélisation « MARC » (IFREMER) **36**

Figure 10 : Localisation des populations utilisées pour cette expérimentation : M = Molène ; S = Saint-Malo et B = Bretteville. La carte de température est issu du site internet de modélisation « MARC » (IFREMER) **72**

Liste des Figures de l'article 1

Figure 1 : Kaplan-Meier survival rate following the first exposure of the two populations to 10^4 bacteria/mL during 24 hours at 18°C. **53**

Figure 2 : Total haemocytes count (THC) during the two exposures of (A) Saint-Malo and (B) Molène. **54**

Figure 3 : Phagocytosis index based on micro-beads engulfment (percentage of haemocytes containing three or more fluorescent beads relative to total haemocytes) during two successive infections of abalone from (A) Saint-Malo and (B) Molène. **55**

Figure 4 : Percentage of positive individuals for *V.harveyi* (n=9) in (A) haemolymph and (B) gills obtained by qPCR using specific primers and a TagMan probe. **57**

Figure 5 : 3-dimensional fluorescence microscopy (x60) pictures of a haemocyte (cytoskeleton in orange and nucleus in blue) which has phagocytosed GFP-labelled *V. harveyi* (green). **58**

Figure 6 : Impact of two concentrations of extracellular products of *V. harveyi* on phagocytosis of GFP-labelled bacteria. **59**

Figure 7 : Growth curves of the (A) non-virulent strain LMG7890 and (B) the virulent strain ORM4 in the serum of abalones. (C) Growth rate of the LMG 7890 and ORM4 strains in abalone serum are expressed as a percentage of the maximum growth rate in the LBS control. **60**

Liste des Figures de l'article 2

Figure 1 : Experimental design for the two populations Molène and Saint-Malo. **79**

Figure 2 : Kaplan-Meier survival rate following the two first exposures of the three populations to 10^5 bacteria/mL during 24 hours at 17°C and 18°C for the first and the second exposure respectively. **82**

Figure 3 : Gene ontology annotation (GO term) of *H. tuberculata*. Distribution of the 14 038 genes which have Go term among the main subcategories of Cellular component (red), Molecular functions (green) and biological Process (blue) **84**

Figure 4 : (A) Venn diagram with each pairxaise comparison. (B) Principal Component Analysis (PCA) build with all DEGs. **85**

Figure 5 : Heatmap built with all the contigs differentially expressed among the four conditions. **86**

Figure 6 : (A,B) plot of the expression level of contigs in each clusters obtained from the heatmap and hierarchical observation. (C,D) Venn diagrams showing the number of contigs that are shared by the pairwise comparisons SI vs MI and MI vs MU. **87**

Figure 7 : Apoptosis pathway. **99**

Liste des Figures de l'article 3

Figure 1 : carte de température d'aout 2016 en Bretagne nord issue de donnée de modélisation du site MARC (IFREMER) **112**

Figure 2 : Distribution des valeurs de CpGo/e sur les 16 967 transcrits annotés de Saint-Malo ainsi que la distribution des valeurs de GpCo/e. **117**

Figure 3 : Distribution des valeurs de CpGo/e sur les 33 746 ADNc de *Caenorabditis elegans*. **118**

Figure 4 : Valeur moyenne de CpGo/e par Terme GO de fonction générale. **119**

Figure 5 : Valeur moyenne de CpGo/e par Terme GO spécifique à la réponse immunitaire. **120**

Figure 6 : Distribution des valeurs de CpGo/e des transcriptomes globaux de Molène et de Saint-Malo ainsi que des clusters C1 et C2. **121**

Liste des abréviations

ROS: reactive oxygen species

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

CpG: Cytosine guanine

CpGo/e: rapport CpG observé sur attendue

DNMT(s): DNA methyltransferase

ECP(s): extra-cellular products

FREP(s): fibrinogen-related proteins

GFP: Green Fluorescent Protein

IKB: inhibiteur de NF- κ B

IKK: I κ B kinase

LPS: lipopolysaccharides

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MBD(s): Methyl-CpG-binding domain proteins

MKK: Mitogen-activated protein kinase kinase

NF- κ B: nuclear factor- κ B

PAMP (s): pathogen-associated molecular patterns

PGN: peptidoglycane

PGRP: Peptidoglycan recognition proteins

PRR(s): Pattern Recognition Receptors

T3SS: système de sécrétion de type III

THC: Total hemocyt count

TLR(s): Toll Like Receptor

TNF: Tumor necrosis factor

INTRODUCTION



Juste à ce moment, je ne sais pourquoi, elles se mirent à courir. Ce qu'il y avait de plus curieux, c'est que les arbres et tous les objets qui les entouraient ne changeaient jamais de place : elles avaient beau aller vite, jamais elles ne passaient devant rien.

« Je me demande si les choses se déplacent en même temps que nous ? » pensait la pauvre Alice, tout intriguée. (...)

— Mais voyons, s'exclama-t-elle, je crois vraiment que nous n'avons pas bougé de sous cet arbre ! Tout est exactement comme c'était !

— Bien sûr, répliqua la Reine : comment voudrais-tu que ce fût ?

— Ma foi, dans mon pays à moi, répondit Alice, encore un peu essoufflée, on arriverait généralement à un autre endroit si on courait très vite pendant longtemps, comme nous venons de le faire.

— On va bien lentement dans ton pays ! Ici, vois-tu, on est obligé de courir tant qu'on peut pour rester au même endroit », dit la reine. « Si tu veux te déplacer, tu dois courir au moins deux fois plus vite !

Lewis Carroll

Introduction générale

En 1973, le chercheur américain Leigh Van Valen, qui étudiait l'évolution des espèces, a utilisé de manière astucieuse le passage précédemment cité et extrait de l'ouvrage de Lewis Carroll, « *De l'autre côté du miroir* », pour formuler sa théorie qu'il appellera : « théorie de la Reine Rouge » (Van Valen 1973). Il compara cette scène ubuesque dans laquelle Alice et la Reine Rouge qui malgré une course effrénée n'avançaient pas d'un pouce, à la course évolutive, tout aussi effrénée, qu'effectuent les organismes vivants entre eux dans le seul but de se maintenir dans leur milieu, et ainsi rester au même endroit ! En effet, tout organisme doit constamment évoluer pour s'adapter à son milieu, lui-même constitué d'organismes qui évoluent pour garder leur place et éviter l'extinction. Ainsi, l'évolution de l'un impose l'évolution de l'autre lesquelles s'annulent mutuellement. Cette théorie de la Reine Rouge est particulièrement adaptée dans la description de coévolution d'un système proie-prédateur ou encore d'un système hôte-pathogène. Dans ce dernier système, chaque organisme développe de nouvelles « armes » pour, dans le cas de l'agent pathogène, envahir, survivre et se développer au sein de son hôte, et dans le cas de l'hôte, éradiquer ou simplement limiter son développement afin de survivre et de maximiser sa fitness (ou valeur adaptative). Cette compétition entre hôte et pathogène est communément nommée course à l'armement. Dans un environnement relativement stable, aucun vainqueur ni vaincu ne résulte de cette course, de telle sorte qu'aucun des deux, malgré leur évolution perpétuelle, ne prend un avantage trop important sur l'autre. Ainsi, les deux courent à la même vitesse. Cependant, cette stabilité environnementale dont dépend l'équilibre de ces relations a été, ces dernières décennies, fortement altérée. En effet, en l'espace de quelques décennies, de nombreux changements sont apparus dont une grande partie est due à l'activité humaine, comme la dégradation des milieux naturels, la pollution, l'introduction d'espèces ou encore la surexploitation des ressources. Ces activités induisent directement ou indirectement des changements plus globaux, comme l'acidification des océans, le dérèglement climatique ou encore l'augmentation des températures. Ces changements, et en particulier leur caractère brutal, ne sont pas sans conséquences sur les relations hôte-pathogène.

Dans un contexte d'interaction hôte-pathogène, l'augmentation de température s'avère être particulièrement délétère car elle peut déséquilibrer cette course à l'armement en favorisant le développement de certains pathogènes. Il est admis aujourd'hui qu'elle est la principale cause de l'émergence de nombreuses maladies chez un grand nombre d'animaux terrestres et marins (Harvell et al. 2002). Dans le milieu marin, les bactéries du genre *Vibrio* occupent une grande place dans l'émergence de maladies observées ces dernières décennies (Le Roux et al. 2015). En effet, les bactéries du genre *Vibrio*, appartenant à la famille des Vibrionaceae, sont typiquement aquatiques, et principalement marines. Ce sont de petits bacilles gram négatifs généralement mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles. Tous les vibrions ne sont pas pathogènes, certains sont même impliqués dans des symbioses mutualistes avec des organismes marins. Un exemple intéressant est celui de *Vibrio fischeri*, qui colonise de manière très spécifique les organes lumineux des juvéniles de calmar et qui est responsable de la production de lumière permettant au calmar de communiquer ou encore d'attirer des proies (Koch et al. 2014). Chez l'ormeau, ces relations symbiotiques peuvent même revêtir une importance substantielle comme *Vibrio haliotocoli* qui colonise leur système digestif et qui, grâce à sa capacité de fermentation des alginates, composant essentiel des algues brunes, joue un rôle dans le processus de digestion de cette algue (Sawabe et al. 2003). Malheureusement, malgré l'existence d'exemple de ce type, *Vibrio* reste plus célèbre pour son implication dans de nombreuses maladies qui touchent de nombreux animaux mais aussi l'humain. Les plus célèbres d'entre elles sont associées à *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* et se transmettent à l'homme par la consommation d'eau contaminée ou de coquillages. Les deux dernières sont mortelles, et *V. cholerae*, qui produit la toxine cholérique, est responsable de pandémie très importante (Sack et al. 2004). De même, les maladies causées par *Vibrio* et affectant des animaux marins sont nombreuses (Le Roux et al. 2015). La majorité des bactéries du genre *Vibrio* pousse préférentiellement à des températures chaudes. Le genre *Vibrio* tire donc un grand bénéfice de l'augmentation de température et a connu une expansion importante du fait du réchauffement. Vezzulli et al. (2012) ont d'ailleurs démontré à l'aide de méthodes de métagénomique l'augmentation significative de l'abondance des *Vibrio* au sein des communautés phytoplanctoniques de la mer du Nord. Ils ont aussi démontré que l'augmentation des températures de surface explique 45% de la variance observée au sein des données associées à *Vibrio*.

L'augmentation de la température peut aussi affecter négativement la physiologie ainsi que l'immunité de l'hôte diminuant ainsi ses défenses, ce qui est particulièrement le cas des mollusques. En effet, ces derniers sont ectothermes et sédentaires, ce qui les rend particulièrement sensibles à ce type de variation. Pour beaucoup d'entre eux, la maturation sexuelle, l'efficacité du système immunitaire ou encore l'activité globale de leur métabolisme, est assujettie à la température du milieu. Par ailleurs, la sédentarité des mollusques les empêche de se déplacer activement pour suivre leur optimum thermique comme c'est le cas chez les poissons dont la distribution se révèle être très dynamique en fonction des changements globaux (Kaimuddin et al. 2016). Les mollusques marins cumulent donc deux facteurs aggravants, et l'augmentation d'abondance et de pathogénicité des *Vibrio*, dans ce contexte de réchauffement climatique, a donné lieu à l'émergence de nombreuses maladies affectant les animaux de cet embranchement (Paillard et al. 2004). Parmi ces animaux, on retrouve l'ormeau dont plusieurs espèces de par le monde, ont subi de grande mortalité causées par la vibriose. Le clade Harveyi réunit la majorité des espèces de bactérie impliquées dans les vibrioses d'ormeaux avec *V. parahaemolyticus*, pathogène de *Haliotis diversicolor supertexta* (Huang et al. 2001); *Vibrio alginolyticus*, pathogène de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens* et de *H. diversicolor supertexta* (Elston & Lockwood 1983; Liu et al. 2000) ; et *Vibrio harveyi* qui touche *Haliotis diversicolor supertexta* (Nishimori et al. 1998), *Haliotis discus discus* (Sawabe et al. 2007) ainsi qu'une troisième qui nous intéresse tout particulièrement : l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* (Nicolas et al. 2002).

Les ormeaux sont des gastéropodes marins appartenant à la famille Haliotidae, qui regroupe les espèces du genre *Haliotis* (Rafinesque 1815). Ce genre tient son nom des termes de grec ancien « halios » qui désigne la mer, son habitat, et « otis » qui signifie oreille, faisant référence à la forme de sa coquille. Parmi les 56 espèces qui forment ce genre, se trouve *H. tuberculata* (Geiger 1998), décrite pour la première fois par Linné dans son ouvrage *Systema Naturae* (von Linné 1766) et dont les premiers fossiles retrouvés dateraient du Miocène (Geiger & Groves 1999). Cette espèce s'étend des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, au nord, aux îles Canaries et au littoral sénégalais, au sud (Figure 1) (Gaillard 1958). Certaines différences morphologiques et le séquençage de la « sperm » lysine a donné lieu à la différenciation de deux sous-espèces, *H. tuberculata tuberculata*, répartition Nord et *Haliotis tuberculata coccinea*, répartition sud, qui auraient

été séparées il y a 1,5 million d'années du fait de l'établissement de courants contraires suite à l'ouverture du détroit de Gibraltar (Van Wormhoudt et al. 2011).

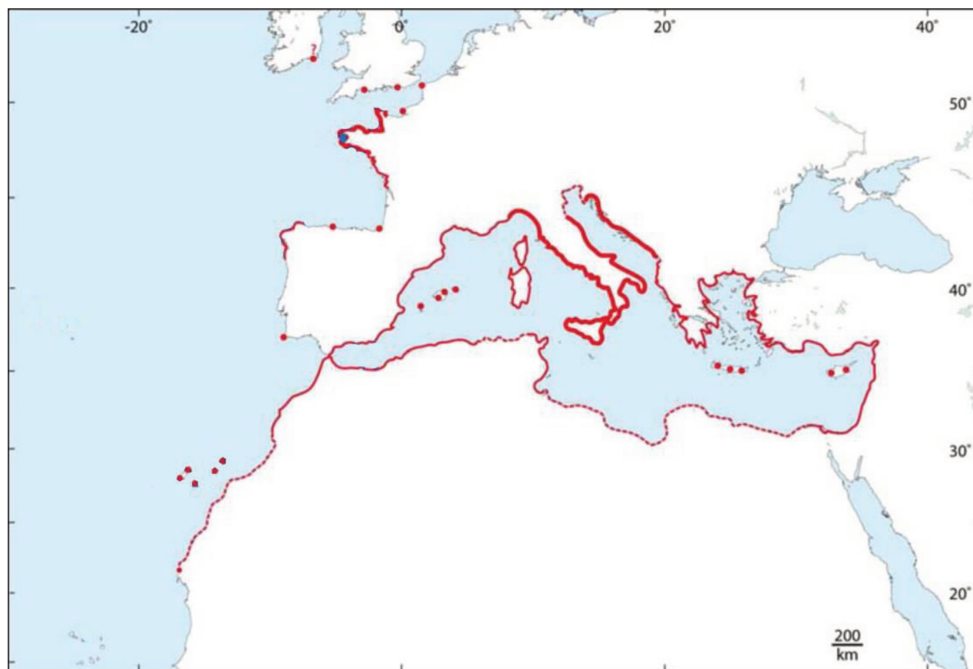


Figure 1: Répartition de l'orveau *Haliotis tuberculata*. L'épaisseur des traits représente la densité des populations et les points représentent les populations sporadiques. Carte adaptée de (Gaillard 1958)

Les ormeaux vivent généralement à de faibles profondeurs, le plus souvent fixés à des rochers et cachés dans des anfractuosités entre +1 et -10 m par rapport au 0 des cartes. Si ce type d'habitat le protège des prédateurs, cette faible profondeur l'expose aussi aux variations de température. L'orveau s'attache au rocher et se déplace grâce à un large pied musculeux que l'on appelle aussi muscle pédieux (Figure 2). Il est essentiellement herbivore et se nourrit de macro-algues à l'aide de sa radula qui est une sorte de langue munie de nombreuses dents chitineuses (Figure 2). L'orveau peut se nourrir d'algues brunes et vertes mais affectionne particulièrement les algues rouges dont *Palmaria palmata* qui lui permet une bonne croissance (Basuyaux 1997). La coquille de l'orveau est percée de 5 à 7 pores permettant à l'eau de circuler et baigner les deux branchies qui assurent sa respiration. Ces pores permettent aussi l'évacuation des fèces ainsi que l'émission de gamètes.

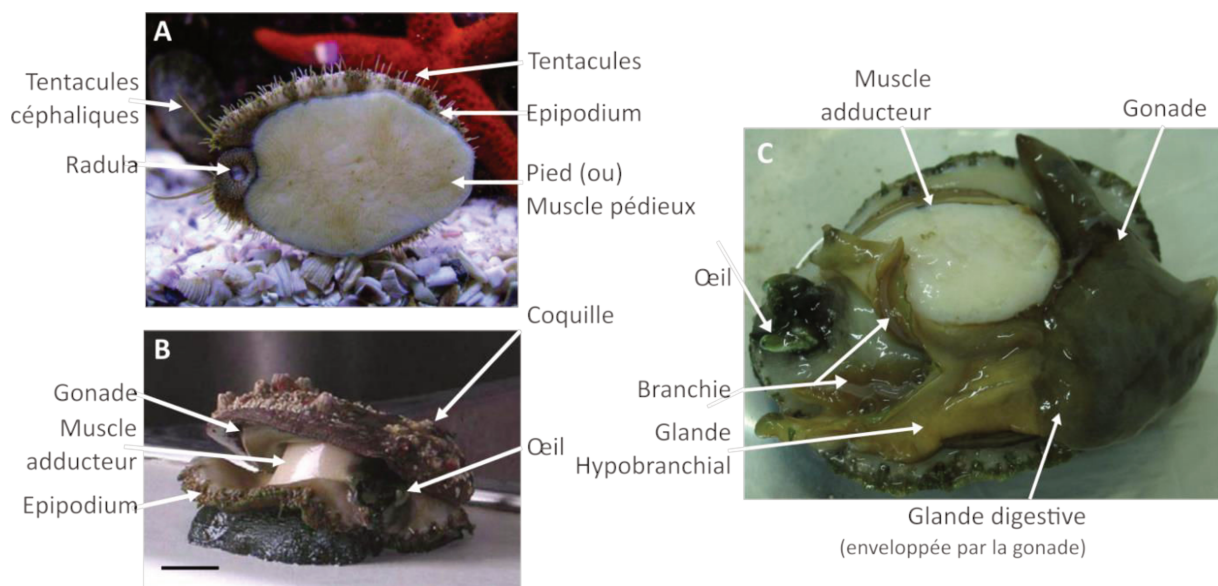


Figure 2: Anatomie de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*. Photo A et B extraite de Travers (2008). Photo C prise lors des expérimentations de 2013 de ce travail.

En Atlantique nord, la pêche professionnelle de cette espèce a été autorisée en 1994 (Huchette & Clavier 2004). En 1997, un total de 97 tonnes a été pêchées dans l'année et une station biologique Normande (Synergie Mer Et Littoral : SMEL) développait la production d'ormeaux en milieu semi-fermé produisant à cette époque quelques centaines de kilogrammes d'ormeaux par an (Nicolas et al. 2002). Ainsi, bien que balbutiante, l'activité autour de l'ormeau avait pris son essor avec quelques petites fermes aquacoles en Normandie (Basuyaux 1997). C'est à cette même période que les mortalités firent leur apparition touchant sévèrement certaines populations naturelles d'ormeaux ainsi que les structures nouvellement créées par le SMEL. Ainsi, les mortalités de l'ormeau européen *H. tuberculata* ont débuté en France à la fin de l'été 1997 en Bretagne sud, près de Concarneau. En 1998, de très fortes mortalités atteignant 70 à 90% ont été enregistrées près de Saint-Malo en Bretagne nord. Elles atteignirent les îles Anglo-Normande en 1999. Ces mortalités furent rapidement attribuées à *Vibrio carchariae*, une espèce qui plus tard sera assimilée au clade *V. harveyi* (Gauger & Gómez-Chiarri 2002).

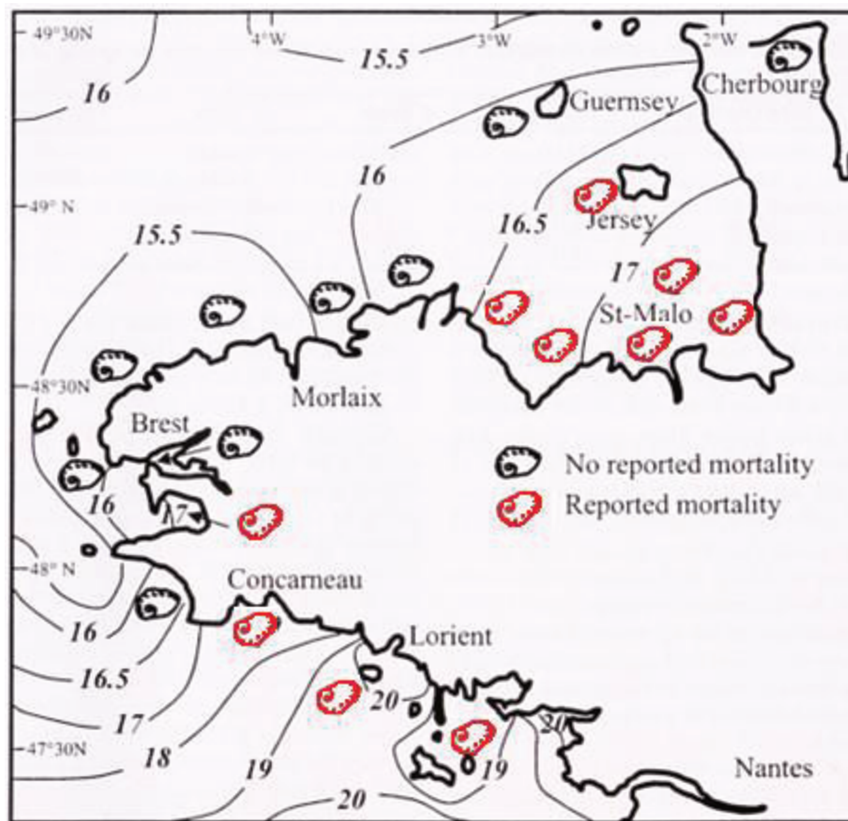


Figure 3: Carte de Bretagne indiquant les zones où des mortalités ont été observées *in situ*, et les isothermes de températures estivales maximales de l'eau en été. Carte modifiée de Huchette & Clavier (2004).

L'implication de la température dans le développement de la maladie a rapidement été démontrée. Tout d'abord, Nicolas et al. (2002) démontrèrent lors de l'isolement de la bactérie, une capacité de croissance à de hautes températures (37°C) et aucune croissance à des faibles températures (4°C), ce qui est le cas de la plupart des vibrions qui deviennent donc plus dangereux dans des milieux chauds. Il est important de souligner que cette bactérie montre une croissance très faible aux températures inférieures à 18°C (Travers et al. 2009). De plus, les mortalités très disparates observées sur les côtes bretonnes et normandes ont montré une structuration de la distribution des épizooties en fonction des isothermes de température estivales maximum (Figure 3). Ainsi, les populations d'ormeaux des zones les plus chaudes (Morbihan et côte d'Armor) ont été très sévèrement touchées tandis que celles de la pointe Bretagne, où règnent des températures plus froides ont été épargnées. Plus tard, des approches d'infections expérimentales ont mis en évidence le déclenchement de mortalités à des températures excédant 17°C (Travers et al. 2009). Par ailleurs, dans le cas des sites normands, et plus particulièrement les principales zones

touchées par la maladie, Travers et collaborateurs ont montré une augmentation de température allant de 1 à 1,5°C en 17 ans (Figure 4A). Le réchauffement climatique a donc permis d'atteindre, dans certaines régions, ce seuil de température de 17°C à partir duquel cette bactérie devient virulente pour l'ormeau.

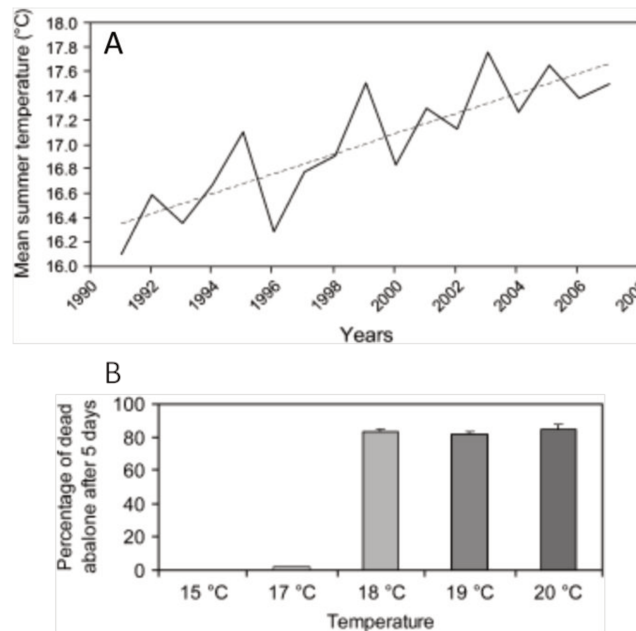


Figure 4: (A) Températures estivales moyennes de l'eau à Flammanville (Normandie). La barre en pointillé indique la tendance. (B) influence de la température sur la mortalité d'ormeaux matures exposés à *V. harveyi* (Travers, Basuyaux, et al. 2009).

La température a une influence importante sur les bactéries, non seulement sur leur vitesse de croissance, mais aussi sur leurs facteurs de virulence (Travers et al. 2015; Colquhoun & Sørum 2001). En effet, les bactéries pathogènes disposent de tout un arsenal moléculaire leur permettant d'infecter un hôte, communément appelé facteurs de virulence. Le succès d'une infection résultant d'interactions entre l'hôte et le pathogène, ces facteurs de virulence ne se définissent pas seulement par leurs capacités à provoquer des dommages à l'hôte, mais incluent aussi tous les éléments nécessaires pour adhérer, envahir, neutraliser les défenses et se multiplier au sein de l'hôte (Casadevall & Pirofski 1999). Chez *Vibrio coralliilyticus*, pathogènes de nombreux coraux, l'augmentation de température (>27°C) joue un rôle direct sur l'expression de facteurs de virulence tel que la motilité, l'adhésion ou encore la résistance aux composés antimicrobiens (Kimes et al. 2011). Peu d'études ont été menées sur les facteurs de virulence du clade Harveyi, et la plupart d'entre elles concernent

des souches pathogènes de poissons et de crevettes (Austin & Zhang 2006). *V. harveyi* est une bactérie très diversifiée, impliquée dans de nombreuses maladies et dont les facteurs de virulences sont très variés. On peut cependant remarquer l'importance des produits extracellulaires (ECPs pour « extra-cellular products ») dans la pathogénicité des *V. harveyi*, telle que l'excrétion de protéases, de phospholipases, et de sidérophores dans l'infection du crustacé *Artemia franciscana* (Soto-Rodriguez et al. 2003), ou encore d'hémolysine dans l'infection du saumon (Zhong et al. 2006; Zhang & Austin 2000). Une autre caractéristique remarquable chez *V. harveyi* est la présence d'un système de sécrétion de type III dont l'expression est régulée par le « quorum sensing » (Henke & Bassler 2004). Le système de sécrétion de type III permet aux bactéries d'injecter des facteurs de virulence directement dans le cytoplasme des cellules. Ce système de sécrétion est utilisé par de nombreux pathogènes, pour manipuler les voies de transduction du signal de l'hôte à son avantage, lui permettant par exemple d'inhiber l'activation de l'apoptose ou encore d'inhiber la réponse inflammatoire de l'hôte (Orth et al. 1999; Frey & Origgi 2016). Ce mécanisme de virulence étant très coûteux, il est finement régulé chez *V. harveyi* par le « quorum sensing » (Darshanee Ruwandeepika et al. 2015). Le « quorum sensing », ou détection du quorum, est un mode de communication utilisé par les bactéries pour communiquer entre elles par l'intermédiaire de molécules appelées auto-inducteur qu'elles produisent elle-même. Ce système leur permet de détecter des seuils de densités afin de coordonner l'expression de gène de l'ensemble d'une communauté bactérienne. Ce système a été très étudié chez les bactéries du clade Harveyi et a été mis en lien avec le déclenchement de production de facteurs de virulence comme la production d'ECPs ou encore l'utilisation du système de sécrétion de type III (Defoirdt et al. 2008).

Bien que la température soit un facteur essentiel au développement de *V. harveyi* chez l'ormeau, elle ne suffit pas à déclencher la maladie. En effet, la gamétogénèse joue aussi un rôle prépondérant dans le déclenchement des maladies. *V. harveyi* est une bactérie opportuniste et ne devient pathogène qu'à la seule condition que son hôte soit déjà affaibli. Or, la reproduction représente un effort considérable chez l'ormeau. Comme chez la majorité des mollusques marins dont la fécondation est externe, le succès reproducteur repose sur l'émission d'une quantité très importante de gamètes et la reproduction représente une consommation d'énergie considérable. Après rencontre des gamètes, l'œuf

fécondé donne naissance en 10 heures à une larve trochophore planctonique puis à une larve véligère (~20h après fécondation). La phase planctonique dure entre 3 et 10 jours après quoi la larve gagne le fond et devient benthique (Figure 5).

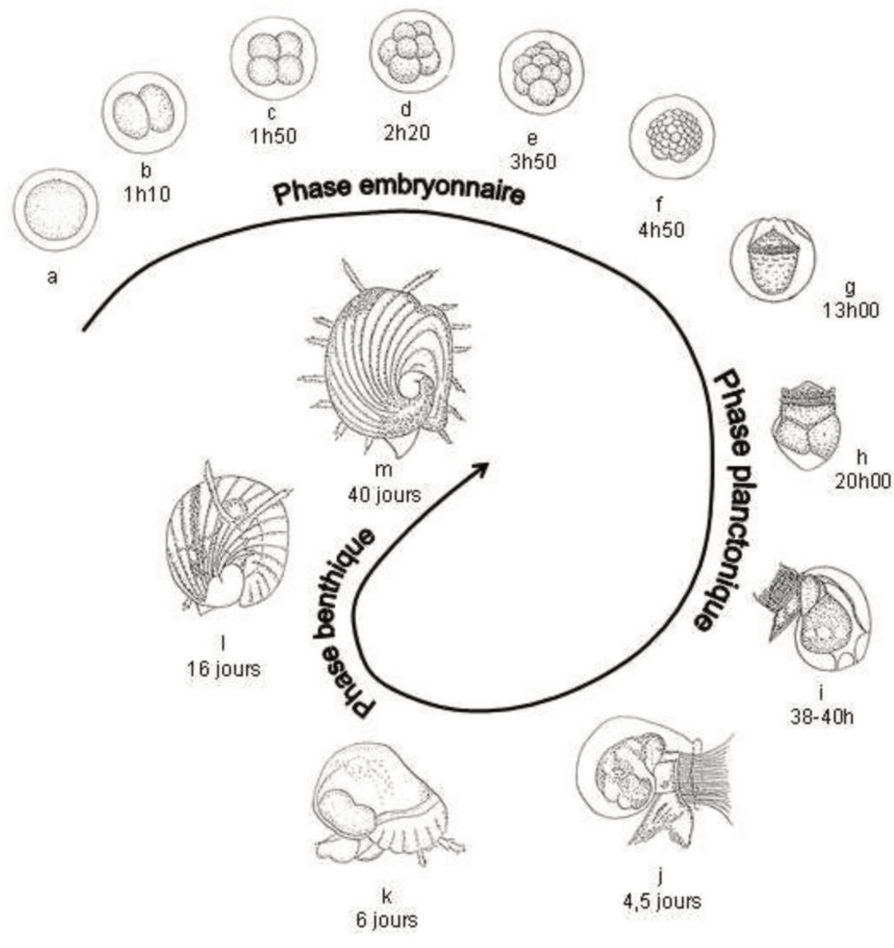


Figure 5 : Développement larvaire de l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Travers 2008). a : œuf (ø0,21 mm), b : première division, c : deuxième division, d : troisième division, e : quatrième division, f : stade morula, g : larve trochophore (ø0,20 mm), h : larve véligère (ø0,21 mm), i : larve véligère après éclosion, j : larve véligère à la fin du stade planctonique (ø0,26 mm), k : larve rampante (ø0,20 mm), l : larve rampante (0,47 mm de longueur), m : juvénile (2,2 mm de longueur).

La période ainsi que l'intensité de la reproduction dépend de trois facteurs : la température, la photopériode et la disponibilité en nourriture. La période de ponte des ormeaux s'étend de mi-juin à mi-novembre après quoi l'ormeau entame une période de repos sexuel qui durera jusqu'à la fin du mois de mars. La gamétogénèse se déclenche en fonction de la photopériode (été) et de la température. Une fois encore, la température joue un rôle important car la gamétogénèse ne s'effectue qu'à partir de 7°C et se poursuit jusqu'à

atteindre 1300-1500 degrés jour (Basuyaux 1997). Le régime thermique subit par les différentes populations d'ormeaux étant parfois bien contrasté, le déroulement de la gamétogénèse peut être décalé dans le temps entre chaque population, ce qui explique le caractère asynchrone observé sur les pontes d'ormeaux d'un site à l'autre (Hayashi 1980). En fin de gamétogénèse, la gonade occupe une place importante dans les organes de l'ormeau comme le montre la Figure 2. Cette caractéristique est commune chez les mollusques marins et a d'ailleurs été associée à un fort déficit énergétique en fin de période de reproduction chez l'huître (Dridi et al. 2007). C'est aussi le cas de l'ormeau européen chez qui le développement de la gonade s'accompagne d'une diminution de glycogène dans le muscle, suggérant une forte mobilisation d'énergie dans la gamétogénèse (Hayashi 1983). *H. tuberculata* n'échappe donc pas à cette règle universelle qu'est le compromis énergétique (aussi appelé « trade-off ») et ce « gouffre énergétique » que représente la gamétogénèse n'est pas sans conséquence sur la physiologie de l'ormeau. Il a été mis en évidence une dépression importante du système immunitaire d'*H. tuberculata* corrélée à la gamétogénèse ainsi qu'un lien direct entre cette diminution et la susceptibilité des ormeaux à *V. harveyi* (Figure 5) (M.-A. Travers, Le Goïc, et al. 2008). Bien évidemment, le système immunitaire joue un rôle crucial dans les interactions entre *H. tuberculata* et *V. harveyi*, et de son efficacité dépend la survie ou la mort de l'ormeau lors d'une infection. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les mortalités en infections expérimentales peuvent être obtenues avec des ormeaux non matures mais stressés par la manipulation (retournement des ormeaux réguliers). En effet, ce stress induit aussi une dépression du système immunitaire menant aux mêmes résultats de survie qu'avec des ormeaux matures (Cardinaud, Offret, et al. 2014). Ce résultat renforce l'importance de l'immunité dans la réponse de l'ormeau et le caractère opportuniste de *V. harveyi*.

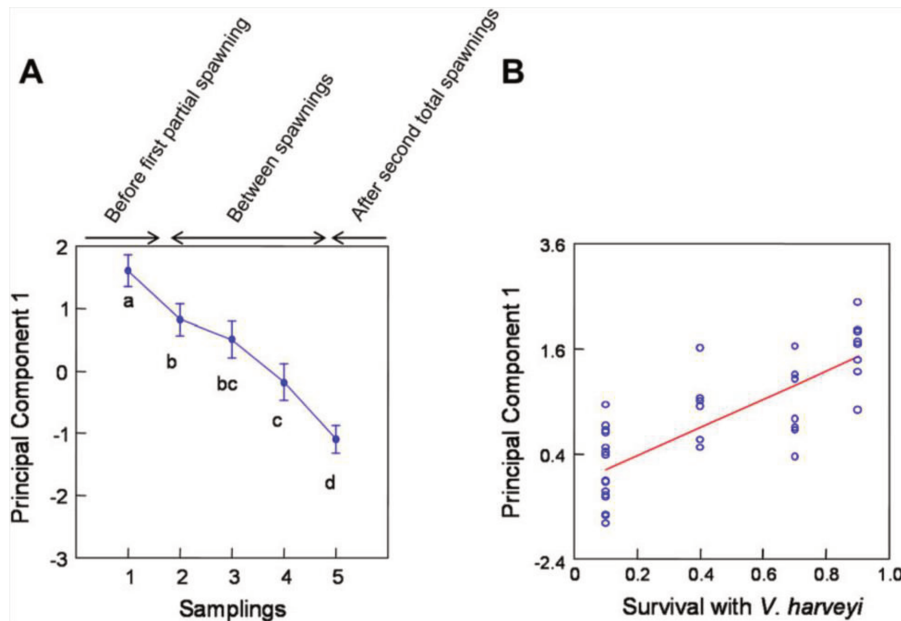


Figure 6: (A) Evolution des variables immunitaires d'*Haliotis tuberculata* pendant la gamétogenèse et (B) en corrélation avec le taux de survie en présence de *V. harveyi*. La composante 1 (« Principal Component 1 ») est extraite d'une analyse en composante principale expliquant 34% de la variance et caractérisée par les variables : complexité des hémocytes, comptage total des hémocytes, activité phénol-oxydase et indice de phagocytose. (Travers et al. 2008)

Les organismes marins, et particulièrement les mollusques par leur sédentarité, doivent faire face à de nombreux parasites dans leurs milieux naturels. L'invasion de potentiel agents pathogènes doit donc être réprimée, jugulée, afin d'assurer la survie dans un milieu bouillonnant de micro-organismes, et cette fonction est réalisée par le système immunitaire. A l'instar de l'ensemble des invertébrés, l'ormeau ne possède pas d'immunité acquise comme chez les vertébrés. L'ensemble de sa réponse immunitaire repose donc sur l'immunité innée. Celle-ci est assurée par les hémocytes : ce sont de petites cellules circulantes présentes dans le système circulatoire de l'ormeau mais aussi capables de migrer vers d'autres tissus. Il en existe deux types chez les invertébrés : les granulocytes et les hyalinocytes, cependant, ces derniers sont largement majoritaires chez *H. tuberculata* (Travers et al. 2008). Ces cellules sont impliquées dans de nombreux processus comme la digestion, le transport de nutriments, la réparation tissulaire et coquillière, et la résorption gonadique. Elles jouent surtout un rôle très important dans l'immunité en assurant la mise en place des deux types de réponses de l'immunité innée : l'immunité cellulaire et l'immunité humorale.

La phagocytose et l'encapsulation sont les deux mécanismes de l'immunité cellulaire. La phagocytose permet aux hémocytes d'internaliser et de lyser les petites cellules du non-soi. Si le parasite est trop gros, il est encapsulé par les hémocytes : ceux-ci s'agglutinent autour du parasite afin de relarguer des composés cytotoxiques pour le détruire. Dans le cas d'infection par des bactéries, la phagocytose constitue la première ligne de défense. Ce processus requiert le succès de plusieurs étapes : la reconnaissance, l'internalisation, la dégradation de la cellule et l'évacuation (étapes décrites en Figure 6).

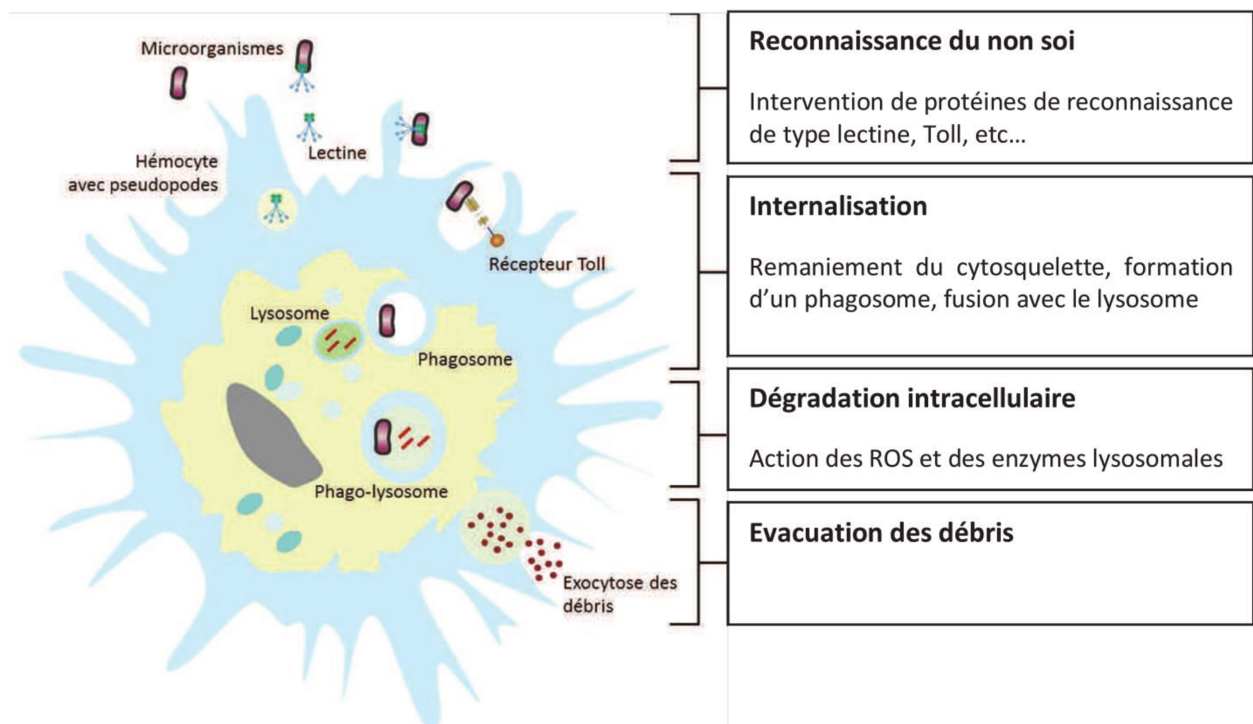


Figure 7 : Schéma hypothétique des différentes étapes du processus de phagocytose. (Cardinaud 2013)

Pour les parasites extracellulaires, la stratégie consiste donc à éviter la phagocytose en perturbant l'une de ces étapes comme *Vibrio aestuarianus* et *Vibrio tubiashi*, tous deux pathogènes de l'huître et dont les ECPs inhibent l'activité de phagocytose en déstabilisant le cytosquelette des hémocytes (Mersni-Achour et al. 2014; Labreuche et al. 2010). La souche pathogène de *V. harveyi* semble aussi inhiber la phagocytose. En effet, alors que la souche non-pathogène de *V. harveyi* LMG 7890 provoque l'activation de la phagocytose, la souche ORM4 ne provoque aucune réponse des hémocytes (Travers et al. 2009). Une autre étude a aussi montré une inhibition importante de la phagocytose après 24 heures d'exposition à la bactérie (Cardinaud et al. 2015). Comme indiqué sur la Figure 6, la phagocytose

s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species »). Ces molécules, ainsi que les enzymes lysosomales, sont responsables de la dégradation intracellulaire de la cellule phagocytée. Or, ces ROS aussi sont inhibés par *V. harveyi*. L'inhibition des ROS fait aussi partie des stratégies utilisées par les bactéries pour survivre au sein de leur hôte (Flannagan et al. 2009).

Les hémocytes sont aussi responsables de l'immunité humorale. Celle-ci consiste en la sécrétion de molécules solubles et cytotoxiques telles que les peptides antimicrobiens, l'activation de la voie phénoloxydase (Travers et al. 2008) ou encore la sécrétion d'inhibiteurs de protéases (Bathige et al. 2015). Cependant, bien que ces mécanismes aient été reportés chez le genre *Haliotis* (Bathige et al. 2015; Seo et al. 2016; Travers et al. 2008), il existe peu d'étude sur la réponse humorale de *H. tuberculata* à la vibriose et aucune preuve à ce jour de son implication dans la réponse à ce pathogène.

L'activation de ces deux types de réponses immunitaires nécessite bien sûr la reconnaissance du pathogène par l'hôte afin d'initier la réponse adéquate à l'intrusion. Comme mentionné précédemment, l'ormeau ne possède pas de système immunitaire adaptatif. Cependant, cette absence peut être compensée par une variété très importante de récepteurs de reconnaissance (PRRs pour « Pattern Recognition Receptors »). Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires associés aux microorganismes (PAMP pour « pathogen-associated molecular patterns »). Ces PAMPs sont généralement des constituants membranaires des microorganismes comme les péptidoglycanes (PGN) ou les lipopolysaccharides (LPS). Ces récepteurs, une fois liés à leur cible, activent les voies de transduction du signal qui mèneront à la réponse immunitaire appropriée. Ces récepteurs sont généralement à large spectre mais possèdent tout de même une certaine spécificité. La famille des récepteurs à peptidoglycanes (PGRP pour « Peptidoglycan recognition proteins ») incluent par exemple certains récepteurs qui sont spécifiques au PGN type lysine, spécifiques aux bactéries à Gram positif, tandis que d'autres reconnaissent spécifiquement les acides méso-diaminopimélique retrouvés dans les membranes des bactéries à Gram négatif (Zaidman-Rémy et al. 2006). Ainsi, cette famille de PRRs peut différencier les bactéries à Gram négatifs des Gram positifs et induire des réponses immunitaires adaptées. Autre fait intéressant concernant les PRRs: plusieurs études menées sur les récepteurs type Toll (TLR pour « Toll-like receptors »), une famille de récepteurs très importante dans l'immunité

innée, ont démontré que ces PRRs présentaient des spectres très larges et très diversifiés chez les invertébrés marins (Rauta et al. 2014; Wang et al. 2015). Ceci a d'ailleurs été mis en lien avec la quantité et diversité très importante de microorganismes auxquels les invertébrés doivent faire face dans leur environnement. Les « fibrinogen-related proteins » (FREPs) sont aussi très intéressantes (Allam & Raftos 2015). Ce sont des molécules de reconnaissance de type lectine. Ces molécules, excrétées ou membranaires se fixent aux sucres présents sur les parasites facilitant ensuite leur reconnaissance et leur internalisation par les hémocytes (Figure 6). Des études effectuées chez *Biomphalaria glabrata* ont démontré que cette espèce possède un répertoire très important et variable de FREPs. Et ces dernières sont capables de se lier de manière spécifique aux molécules de mucine, présentes sur le parasite *Shistosoma mansoni*, qui elles-mêmes présentent des épitopes très variables (Moné et al. 2010; Gordy et al. 2015). Ainsi, toute cette batterie de récepteurs présents chez les gastéropodes permet la reconnaissance d'un spectre très large, faisant même preuve dans certains cas de spécificité de reconnaissance des bactéries, et permettant l'activation de la réponse immunitaire appropriée.

Si la reconnaissance du pathogène est primordiale dans la réponse immunitaire, la transmission du message ne l'est pas moins. L'étape suivant l'activation des PRRs par les PAMPs est la transduction du signal. Celle-ci peut mettre en jeu différentes voies de signalisation dont le but est de transmettre un message pour finalement induire l'expression de gènes de l'immunité et ainsi provoquer une réaction inflammatoire, la phagocytose, ou encore la production de peptides antimicrobiens. Les voies les plus impliquées dans le déclenchement de ces réponses sont la voie des « Mitogen-activated protein kinases » (MAPK), la voie « c-Jun N-terminal kinases » (JNK), « p38 mitogen-activated protein kinases » (p38 MAPK) ou encore la voie « nuclear factor- κ B » (NF- κ B). Ces voies sont considérées comme étant très conservées dans l'évolution et sont retrouvées chez de nombreux invertébrés marins (Jiang & Wu 2007; X. Zhang et al. 2014; Sun et al. 2016; Travers et al. 2009; Allam & Pales Espinosa 2016; Montagnani et al. 2004). La transduction du signal du récepteur membranaire jusqu'aux facteurs de transcription qui déclencheront la réponse immunitaire s'effectue par différents mécanismes comme la phosphorylation en cascade des protéines ou encore l'ubiquitination de ces protéines. Cependant, toujours dans un contexte de course à l'armement, certaines bactéries ont acquis la capacité d'interférer dans la

transduction du signal en empêchant par exemple la phosphorylation de protéines clés ou en manipulant le système d'ubiquitination (Narayanan & Edelman 2014; Lin & Rikihisa 2004). Chez *H. tuberculata*, il a été démontré que l'infection par la souche ORM4 de *V. harveyi* crée un retard dans la phosphorylation de la p38 MAPK (à l'inverse de la souche non virulente), empêchant ainsi l'activation rapide du processus de phagocytose (Travers et al. 2009). La voie NF- κ B aussi est touchée par l'infection chez l'ormeau avec une inhibition de l'expression de la Rel/NF- κ B observée après 24 heures d'exposition à la bactérie (Cardinaud et al. 2015). La Rel/NF- κ B est un facteur de transcription qui est responsable de l'expression de nombreux gènes de l'immunité. Son inhibition peut représenter un atout majeur pour le développement de la bactérie.

Il faut noter que l'ensemble des systèmes de défense précédemment décrits dans ce travail, et très documenté dans la littérature, concerne la réponse hémoduodénaire. Or, cette réponse ne correspond qu'à la deuxième étape de l'infection, la première étant l'adhésion et la pénétration du pathogène à l'intérieur de son hôte. Chez les mollusques, la plupart des maladies infectieuses sont initiées au niveau de muqueuses, et de nombreuses défenses existent à ce niveau comme la présence de facteur antimicrobien dans le mucus, ou de facteurs inhibant l'adhésion des pathogènes (Allam & Pales Espinosa 2016). Une analyse du profil protéique du mucus de l'huître *C. virginica* a d'ailleurs affichée une quantité très importante d'effecteurs de l'immunité et de PRRs (Espinosa et al. 2015). Ceci n'est pas surprenant étant donné que le mucus est produit à la surface d'organes qui sont en contact direct avec l'environnement extérieur. Chez *H. tuberculata*, il a été observé une concentration de vibrions 5 fois plus importante au niveau des branchies et de la glande hypobranchiale comparée aux autres organes, suggérant que ces deux zones constituent la voie d'entrée de *V. harveyi* dans l'ormeau (Figure 7 A et B) (Cardinaud, Barbou, et al. 2014). Il est donc supposé que le cycle infectieux de cette bactérie consiste en la pénétration de la bactérie dans l'ormeau par les branchies, suivie de sa diffusion dans les organes par l'intermédiaire du système circulatoire de ce dernier pour à terme causer une septicémie (Figure 7 C).

Ainsi, l'ormeau, comme l'ensemble des invertébrés marins, dispose d'un système immunitaire efficace et diversifié. Cela n'empêche pourtant pas *V. harveyi* d'afficher une virulence importante ainsi que des mécanismes efficaces pour contrecarrer la réaction immunitaire de l'ormeau. Si cette bactérie semble bien armée, elle est aussi bien aidée par la gamétogénèse mais aussi par la température du milieu qui dans de nombreux cas a un effet délétère sur le système immunitaire des invertébrés. En effet, chez *Haliotis tuberculata*, la seule augmentation de température (de l'ordre de 3°C) suffit à baisser significativement le taux de phagocytose, et cela chez des animaux immatures (Cardinaud, Offret, et al. 2014). Ce type d'effet a aussi été observé chez *Haliotis diversicolor* avec une diminution de la phagocytose et de l'activité de phénoloxydase avec l'accroissement de la température (Cheng et al. 2004). Ce phénomène a par ailleurs été observé dans de nombreux modèles hôte-pathogène (Dang et al. 2011; Monari et al. 2007; Cheng et al. 2004). Il faut noter que cet effet dépend aussi de l'optimum thermique de chaque espèce. Dans certains cas, comme chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*,

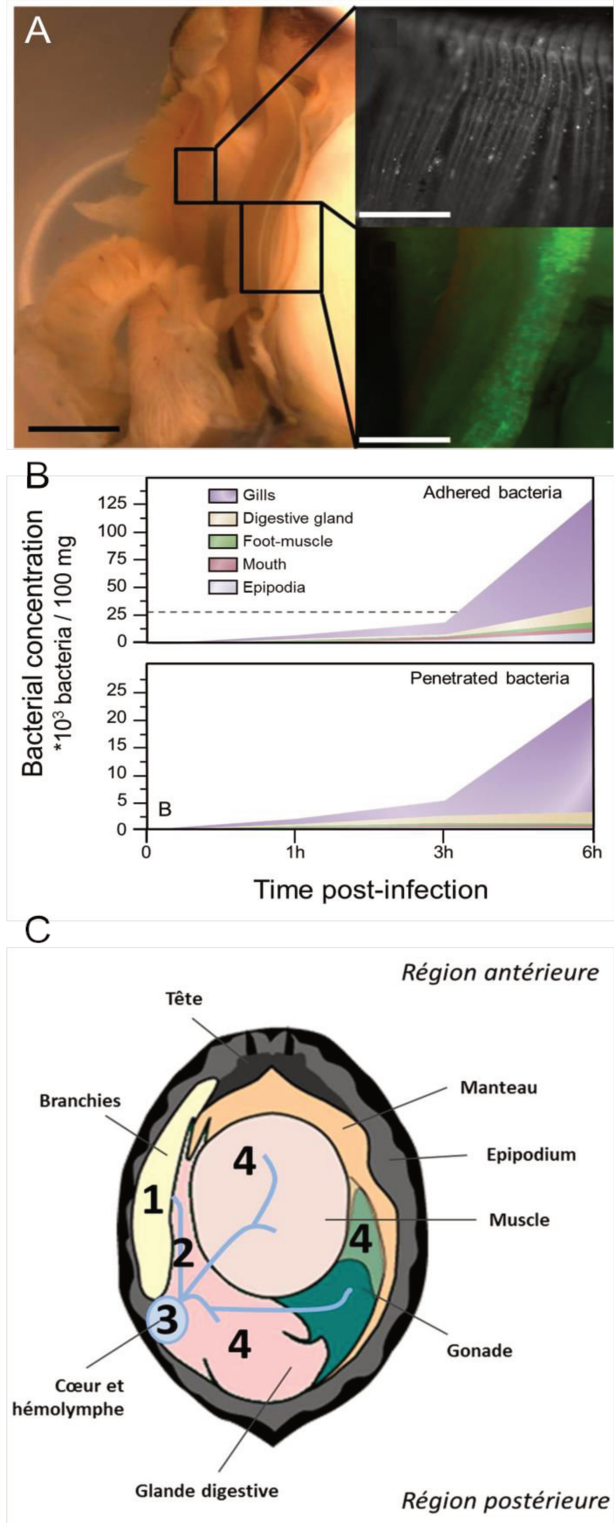


Figure 8 : A : observation microscopique des branchies d'ormeaux immédiatement après une mise en contact avec la souche ORM4 de *V. harveyi* exprimant la GFP (Green fluorescent protein). B : Densité de *V. harveyi* ayant adhéré ou pénétré dans les différents organes de l'ormeau durant une exposition. C : cycle infectieux de *V. harveyi* chez l'ormeau. Figures extraites de Cardinaud (2013).

l'augmentation de température stimule le système immunitaire (Paillard et al. 1999).

Dans les changements globaux, ce n'est pas tant les changements qui sont délétères que la rapidité avec laquelle ils se produisent. Malgré l'avantage certain qu'apporte l'augmentation de température au pathogène, les mollusques marins gardent tout de même le potentiel de s'adapter, et à terme de résister. Ainsi, plusieurs cas de maladies émergentes, après avoir provoquées de grandes mortalités, ont été suivis par l'apparition de populations résistantes. Cela a été le cas par exemple de l'ormeau noir *Haliotis cracherodii*, qui a souffert de fortes mortalités dues à une bactérie du genre *Rickettsia*, induisant la maladie intitulée « Withering syndrome ». Friedman et al. (2014) ont démontré une meilleure survie de la descendance d'une population touchée par la maladie comparée à celles des ormeaux issus d'une population naïve. La résistance due à une sélection, naturelle ou artificielle, a été étudiée chez plusieurs espèces de mollusques marins : *Crassostrea gigas* (Dégremont 2011), *Crassostrea virginica* (McDowell et al. 2014), ou encore la palourde *Meretrix meretrix*. Chez cette dernière, la résistance a été associée à la présence de plusieurs SNPs (« single nucleotide polymorphisms ») suggérant un caractère génétique à la résistance de ces palourdes face à leur pathogène et donc une sélection d'individus résistants à la maladie (Liang et al. 2016). L'apparition de résistance est cependant dépendante de plusieurs facteurs et n'est pas forcément observée chez l'ensemble des populations ayant subi de lourdes mortalités (Crane et al. 2013). Munroe et al. (2015) ont d'ailleurs démontré par modélisation l'implication significative de la dispersion larvaire dans l'émergence de résistance. Ainsi, une population isolée et impactée par de fortes mortalités développera une résistance beaucoup plus rapidement qu'une population dont les échanges sont nombreux avec d'autres populations potentiellement naïves.

Ainsi, bien que les mollusques marins soient sévèrement impactés par le réchauffement climatique et l'apparition de maladies, plusieurs mécanismes permettent à ces animaux de s'adapter et de résister à ces nouvelles maladies. La principale raison d'apparition de résistance repose sur la sélection (intensive) de phénotypes résistants causés par les mortalités de masse. Cependant, une nouvelle caractéristique des invertébrés est de plus en plus étudiée : l'amorçage immunitaire, ou « priming immunitaire » (terme qui sera utilisé dans ce document). Cette caractéristique a été appelée priming immunitaire afin de la différencier de l'immunité adaptative des vertébrés qui repose sur l'activité de lymphocytes

et leur production d'immunoglobulines extrêmement variables et donc très spécifique au pathogène, ce qui n'existe pas chez les invertébrés (Rowley & Powell 2007). Cependant, il a été identifié chez les invertébrés plusieurs molécules présentant le même type de caractéristique, à savoir, cette hyper-variabilité potentiellement capable de montrer une réelle spécificité envers différents pathogènes (Dheilly et al. 2015; Dong et al. 2006). Les FREPs identifiés chez *B. glabrata* cités précédemment en sont un très bon exemple. Ces molécules présentent une très grande variabilité intra-spécifique chez cet escargot, et sont capables de différencier des souches de la même espèce du parasite *S. mansoni* (Coustau et al. 2015; Mitta et al. 2012). De plus, le comportement des FREPs, leur variabilité, et leur liaison spécifique avec les mucines de *S. mansoni* ne sont pas sans rappeler le système des immunoglobulines. Une reconnaissance plus spécifique et plus rapide peut donc mener à une meilleure réponse immunitaire en termes de rapidité et d'intensité. Ainsi, toujours chez ce modèle hôte-pathogène, il a été montré une totale protection de *B. glabrata* contre *S. mansoni* lors d'une seconde exposition. Il faut noter que *S. mansoni* est un parasite qui ne tue pas son hôte. Travers et al. (2010) ont déjà suggéré l'existence de priming immunitaire chez *H. tuberculata* lors d'une expérimentation de deux infections successives. Cependant, il est difficile de différencier avec certitude un phénomène de priming immunitaire, d'un phénomène de sélection de phénotypes résistants dans le cas d'un modèle hôte-pathogène dans lequel l'hôte meurt suite à l'infection. Plusieurs études ont cependant suggéré un effet de priming immunitaire sur des modèles d'invertébrés marins tel que *Chlamys farreri* ou *C. gigas* en observant un maintien prolongé de la réponse immunitaire après une première exposition (Cong et al. 2008; T. Zhang et al. 2014). De plus, ce phénomène semblerait être transmissible à la génération suivante (Milutinovic & Kurtz 2016). Cela a été observé chez l'abeille *Apis mellifera* ou encore chez l'artémie *A. franciscana* (Hernández López et al. 2014; Norouzitallab et al. 2016). Très récemment une étude particulièrement intéressante a démontré ce phénomène chez *C. gigas* en injectant de l'ARN double brin afin d'amorcer une réponse antivirale (Green et al. 2016). Les auteurs ont démontré une résistance accrue de la génération F1 issue des huîtres traitées à l'ARN double brin, contre le virus OsHV-1. Plus intéressant encore, il faut noter que les mortalités provoquées par OsHV-1 ne touchent pas les adultes mais le naissain et les juvéniles d'huîtres. Ce traitement, appliqué à des adultes, n'a donc pas d'effet sur leur survie, et les géniteurs utilisés étaient issus d'une population ne présentant pas de résistance particulière à OsHV-1. Ces deux observations permettent donc

de penser que cette résistance transmise à la génération suivante ne serait pas génétique. Les auteurs de cette étude ont donc suggéré l'implication de mécanismes épigénétiques. En effet, les caractéristiques connues de l'épigénétique comprennent d'une part l'implication de l'environnement (traitement à l'ARN double brin) dans la modulation de ces facteurs, et d'autre part leur héritabilité (résistance augmentée de la génération F1). Ainsi, les mécanismes épigénétiques, pourraient être impliqués dans l'acquisition de résistance face à une maladie. Cependant, son étude chez les invertébrés n'en est encore qu'à ses balbutiements.

Le terme épigénétique désigne l'étude des mécanismes induisant des changements dans l'activité des gènes, n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires (Waddington 1942). Cette discipline est née de la réflexion faite que l'analyse de séquences génétiques ne suffit pas à expliquer l'ensemble de la variabilité phénotypique observée dans la nature mais aussi au sein même d'un organisme. Ainsi, l'épigénétique ne vise pas à étudier ce qu'il y a dans le génome, mais ce qu'il y a « au-dessus » du génome et qui va contrôler la manière dont ces gènes seront utilisés (Sengenès 2012). Il existe plusieurs mécanismes épigénétiques qui impliquent tous une modification de la conformation de l'ADN rendant accessible ou inaccessible certaines portions de gènes. Cette conformation peut être modifiée par la modification directe des protéines histones par acétylation, méthylation ou phosphorylation de certains acides aminés (Bannister & Kouzarides 2011). Ces protéines sont associées à l'ADN et peuvent se trouver, selon ces modifications, dans un état ouvert (euchromatine) ou fermé (hétérochromatine). Une autre modification est la méthylation de l'ADN. Ce processus consiste en l'ajout d'un groupement méthyle à l'extrémité 5' d'une cytosine suivie d'une guanine (CpG). Très étudiée chez les vertébrés et en particulier chez l'humain, ce mécanisme ne fait l'objet de recherches concernant les invertébrés que depuis très peu de temps. Le système de méthylation nécessite l'action de plusieurs enzymes : les « DNA methyltransferases » (DNMTs) et les « Methyl-CpG-binding domain proteins » (MBDs). La DNMT3 est responsable de la méthylation *de novo* des cytosines, tandis que la DNMT1 est impliquée dans le maintien des méthylations lors de division cellulaire. C'est donc grâce à cette dernière que les méthylations de l'ADN, et donc leur rôle fonctionnel, peuvent être transmis d'une génération à l'autre. Les MBDs quant à elles se lient spécifiquement aux

cytosines méthylées. Ce set d'enzymes a été retrouvé chez plusieurs invertébrés marins dont la présence de méthylation a été mise en évidence comme chez les coraux (Dimond & Roberts 2015), *C. gigas* (Gavery & Roberts 2013) mais aussi chez *B. glabrata* (Fneich et al. 2013) ainsi que d'autres espèces. Il existe cependant des espèces qui ne semblent pas posséder ce système de méthylation comme *Caenorhabditis elegans* chez qui aucune 5-méthylcytosine (cytosine méthylée) n'est observé (Simpson et al. 1986). Ainsi, la méthylation de l'ADN existe chez les invertébrés. Elle est cependant bien différente de celle observée chez les vertébrés. Chez ces derniers, on peut observer la méthylation de l'ADN dans des zones intragéniques mais aussi dans des zones intergéniques, tandis que les invertébrés présentent la grande majorité de leur méthylation dans des zones intragéniques (Gavery & Roberts 2013; Suzuki et al. 2007). Chez *C. gigas* ainsi que chez d'autres invertébrés marins, il a été observé que les gènes de ménage présentent plus de méthylations que les gènes de nature inductible (Gavery & Roberts 2010). Le rôle précis que jouent ces méthylations dans la régulation des gènes n'est pas encore bien caractérisé chez les invertébrés et plusieurs hypothèses sont à l'étude, comme leur possible rôle dans l'épissage alternatif ou encore dans la régulation de la transcription (Gavery & Roberts 2014). Il est fort probable qu'elles jouent un rôle très important comme le montre leur implication dans le développement larvaire de *C. gigas* (Riviere et al. 2013). En effet, l'ajout de 5-aza-cytidine, un inhibiteur de DNMT perturbe complètement le développement normal de larve de *C. gigas* (Figure 8). Par ailleurs, cette dernière étude montre aussi une modulation très importante des patterns de méthylation des larves durant leurs développement. Les observations sur le priming immunitaire trans-générationnel du naissain d'huître, présentées précédemment par Green et al. (2016), laissent supposer une implication de facteur épigénétique dans l'évolution de la résistance face aux maladies émergentes. Dans un contexte de changements globaux, dans lequel les facteurs environnementaux varient très rapidement, il est probable que l'épigénétique puisse jouer un rôle dans l'adaptation à ces nouvelles conditions. Cependant, malgré l'intérêt grandissant que semble inspirer cette discipline, aucune étude à ce jour n'a été effectuée sur des espèces du genre *Haliotis*.

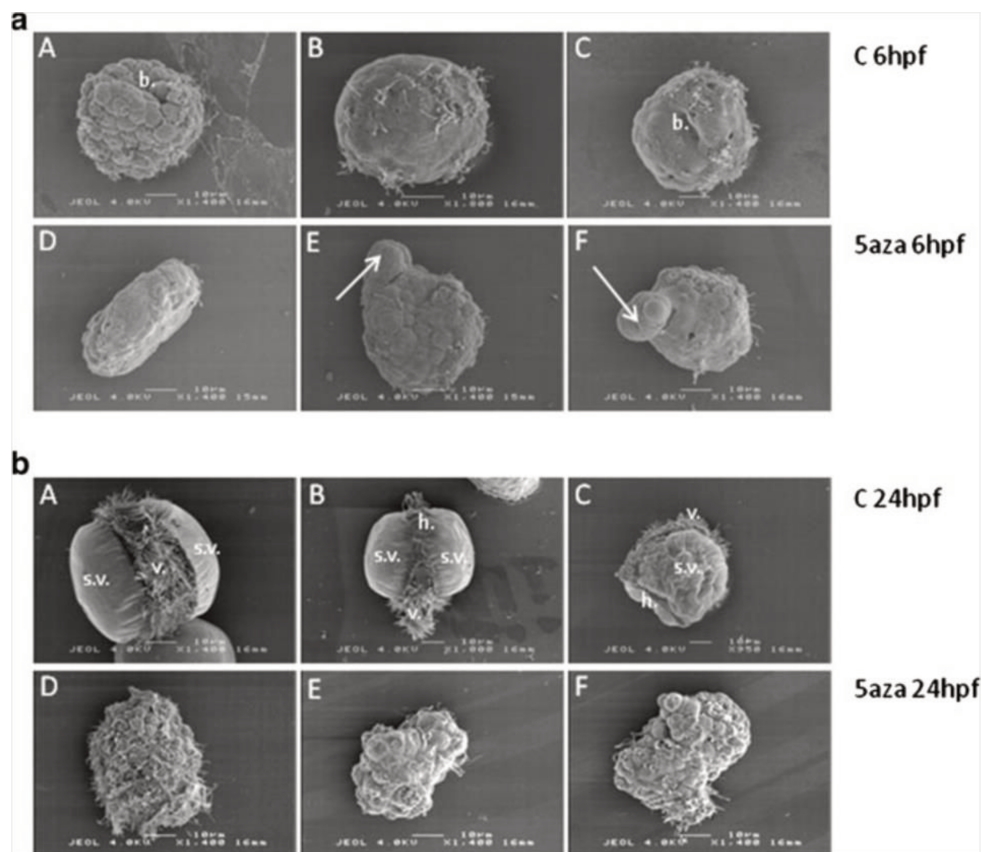


Figure 9: Influence de la 5-aza-cytidine sur des embryons d’huîtres *C. gigas* à 6 et 24 heures post-fertilisation. Observation réalisée microscopie électronique. (A,B,C) en présence de 5-aza-cytidine et (D,E,F) en absence. (a) 6 heures et (b) 24 heures post-fertilisation. Les flèches indiquent des gastrulation externes. La barre d’échelle représente 10µm. (Riviere et al. 2013)

Il est admis aujourd’hui que les augmentations de températures observées ces dernières décennies vont se poursuivre sur une longue période. Il apparait donc crucial, d’un point de vue économique et écologique, d’étudier et de comprendre comment les communautés benthiques peuvent répondre et s’adapter à ce phénomène ainsi qu’aux maladies qui les accompagnent. Le modèle d’étude formée par les interactions entre *Haliotis tuberculata* et *V. harveyi* est parfaitement adapté à ce type de questionnement. Le réchauffement global a de multiples impacts sur les interactions hôte-pathogènes. S’il peut dans un premier temps favoriser l’émergence de nouvelles maladies, il peut aussi dans un deuxième temps provoquer l’émergence de résistance face à ces dernières. La présente thèse vise donc à évaluer la plasticité phénotypique des populations naturelles d’ormeaux européen *H. tuberculata* face à *V. harveyi* et de caractériser leur potentielle résistance à la maladie ainsi que les mécanismes pouvant l’expliquer.

Objectifs

Afin d'étudier les différentes réponses de l'ormeau européen à la maladie, l'ensemble du travail effectué lors de cette thèse a porté sur l'analyse et la comparaison de plusieurs populations naturelles en conditions d'infection expérimentale. Les études réalisées répondent à trois objectifs principaux, présentés dans les trois chapitres suivants et valorisés sous forme d'article.

- **Chapitre 1 : Résistance, mémoire immunitaire et voie d'entrée de *V. harveyi* chez l'ormeau *Haliotis tuberculata*.** Ce premier chapitre vise à déterminer les paramètres qui différencient une population sensible d'une population résistante selon des critères immunitaires. Cette partie explore l'implication potentielle des branchies ainsi que du priming immunitaire chez cette espèce.
- **Chapitre 2 : Analyse transcriptomique de la résistance.** Cette étude vise à comparer l'expression globale des gènes d'un phénotype sensible à celle d'un phénotype résistant par une méthode de séquençage d'ARN totale des hémocytes (RNAseq).
- **Chapitre 3 : La méthylation de l'ADN chez *Haliotis tuberculata*.** Cette partie met à profit la quantité importante de donnée de séquençage obtenue dans le Chapitre 2 pour explorer l'hypothèse de la présence d'un système de méthylation de l'ADN chez *H. tuberculata* ainsi que son implication potentielle dans les différences observées dans l'analyse RNAseq.

Avant-propos

L'ensemble de ce travail repose principalement sur deux expériences d'infection expérimentale. La première a été effectuée à la fin de l'été 2013 et a donné lieu à l'analyse transcriptomique présentée en chapitre 2. La deuxième a été effectuée un an plus tard en 2014 et a permis l'analyse présentée en chapitre 1. L'ordre dans lequel les résultats de ces expérimentations sont présentés dans ce manuscrit ne correspond donc pas à l'ordre dans lequel elles ont été réalisées. En raison de contraintes logistiques liées à toute expérimentation menée sur du vivant, les données de transcriptomique obtenues lors de la première expérimentation ont dû être mises en attente durant la réalisation de la deuxième expérimentation. Les analyses bio-informatiques (Chapitre 2) qui représentent un travail long et compliqué ont donc été réalisées après l'obtention, l'interprétation et la publication des résultats de l'expérimentation de 2014 (Chapitre 1). Le cheminement de ma réflexion, concernant l'interprétation des résultats dans leur ensemble ayant donc suivi ce même ordre, les résultats sont présentés dans ce manuscrit suivant ce dernier.

Il faut donc noter que la découverte de la population résistante a été faite lors de l'expérimentation présentée en chapitre 2.

CHAPITRE 1
RESISTANCE, MEMOIRE
IMMUNITAIRE ET VOIE D'ENTREE
DE *V. HARVEYI* CHEZ L'ORMEAU
HALIOTIS TUBERCULATA

Introduction de l'article

Comparer la réponse immunitaire de populations naturelles présentant des susceptibilités différentes face à l'infection par *V. harveyi* peut être très instructif dans la compréhension des facteurs pouvant mener à la résistance. Par ailleurs, certaines caractéristiques du système immunitaire, associées à des phénomènes de résistance, restent à découvrir chez *H. tuberculata* comme l'existence de mécanismes s'apparentant à la mémoire immunitaire, ou (et) le rôle joué par les branchies comme première barrière contre les invasions de microorganismes pathogènes. C'est donc pour répondre à ces questions que la présente étude a été construite.

Suite à une première série de deux infections expérimentales effectuées à la fin de l'été 2013 sur trois populations naturelles d'ormeaux européen, deux populations ont été sélectionnées pour de plus amples études, car elles présentaient des taux très contrastés de survie. Ces deux populations ont donc été utilisées afin de comparer leurs réponses immunitaires durant une exposition à *V. harveyi*. Une longue étape de maturation en condition contrôlée a été effectuée, car ces deux populations étaient issues de milieux ayant des régimes thermiques très différents. Cette étape est primordiale. Dans le milieu naturel, les périodes de pontes des différentes populations sont asynchrones (Hayashi 1980), ce qui implique que le niveau de maturité d'une population à une date donnée, est différent de celui d'une autre population. Or, le niveau de maturité est clairement corrélé au niveau de susceptibilité des ormeaux (Travers, Le Goïc, et al. 2008). Ainsi, pour comparer les niveaux de susceptibilité à la vibriose de deux populations naturelles d'ormeaux, il est nécessaire que celles-ci arrivent à maturité en même temps. Les ormeaux ont donc été pêchés 4 mois avant l'expérimentation pendant la saison de repos reproductif afin d'effectuer leur gamétogénèse dans les mêmes conditions de température et de photopériode.

L'infection expérimentale présentée dans cet article consiste en deux expositions de 24 heures à *V. harveyi* séparées par quatre semaines de repos. L'intérêt de ce protocole expérimental est non seulement de comparer les paramètres immunitaires de ces deux populations durant les infections mais aussi de déterminer si la première exposition peut

provoquer un effet de priming immunitaire sur ces paramètres lors d'une deuxième exposition.

Les résultats présentés dans cet article sont divisés en deux parties : les paramètres immunitaires mesurés au cours de ces deux infections, et les paramètres mesurés deux mois après les expositions à *V. harveyi*. En effet, disposant d'une population résistante, de nombreux individus ayant survécu à deux expositions ont pu être maintenus afin de réaliser des expérimentations complémentaires et observer un potentiel effet de mémoire immunitaire à plus long terme.

Ce chapitre a donné lieu à la publication d'un article en 2017 dans la revue « *Fish and Shellfish Immunology* ».

Fish & Shellfish Immunology 60 (2017) 255e 264



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

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



Full length article

Immune priming and portal of entry effectors improve response to vibrio infection in a resistant population of the European abalone



Bruno Dubief ^a, Flavia L.D. Nunes ^{a, b}, Olivier Basuyaux ^c, Christine Paillard ^{a, *}

^a Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, University of Brest (UBO), Université Européenne de Bretagne (UEB), Place Nicolas Copernic, 29280, Plouzané, France

^b Ifremer Centre de Bretagne, DYNECO, Laboratoire d'Ecologie Benthique Côtière (LEBCO), 29280, Plouzané, France

^c Synergie Mer et Littoral, Centre Experimental ZAC de Blainville, 50560, Blainville-sur-mer, France

Article

Immune priming and portal of entry effectors improve response to vibrio infection in a resistant population of the European abalone

Bruno Dubief¹, Flavia LD Nunes^{1,2}, Olivier Basuyaux³, Christine Paillard¹

¹ Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, University of Brest (UBO), Université Européenne de Bretagne (UEB), Place Nicolas Copernic, 29280, Plouzané, France

² Ifremer Centre de Bretagne, DYNECO, Laboratoire d'Ecologie Benthique Côtière (LEBCO), 29280, Plouzané

³ Synergie Mer et Littoral, Centre expérimental ZAC de Blainville, 50560 Blainville-sur-mer, France

Abstract

Since 1997, populations of the European abalone *Haliotis tuberculata* suffer mass mortalities attributed to the bacterium *Vibrio harveyi*. These mortalities occur at the spawning season, when the abalone immune system is depressed, and when temperatures exceed 17°C, leading to favorable conditions for *V. harveyi* proliferation. In order to identify mechanisms of disease resistance, experimental successive infections were carried out on two geographically distinct populations: one that has suffered recurrent mortalities (Saint-Malo) and one that has not been impacted by the disease (Molène). Furthermore, abalone surviving these two successive bacterial challenges and uninfected abalone were used for several post-infection analyses. The Saint-Malo population was found to be resistant to *V. harveyi* infection, with a survival rate of 95% compared to 51% for Molène. While *in vitro* quantification of phagocytosis by flow cytometry showed strong inhibition following the first infection, no inhibition of phagocytosis was observed following the second infection for Saint-Malo, suggesting an immune priming effect. Moreover, assays of phagocytosis of GFP-labelled *V. harveyi* performed two months post-infection show an inhibition of phagocytosis by extracellular products of *V. harveyi* for uninfected abalone, while no effect was observed for previously infected abalone from Saint-Malo, suggesting that the effects of immune priming may last upwards of two months. Detection of *V. harveyi* by qPCR showed that a significantly greater number of abalone from the susceptible population were positive for *V. harveyi* in the gills, indicating that portal of entry effectors may play a role in resistance to the disease. Collectively, these results suggest a potential synergistic effect of gills and

haemolymph in the resistance of *H. tuberculata* against *V. harveyi* with an important involvement of the gills, the portal of entry of the bacteria.

Key words:

Immunity; haemocyte; abalone; disease; extracellular products; immune priming; *Vibrio harveyi*; flow cytometry; resistance; phagocytosis; bacterial growth; qPCR; gill

1. Introduction

In the natural environment, the interaction between pathogens and their hosts has important evolutionary repercussions, influencing genetic diversity of both hosts and pathogens (Altizer et al. 2003; Wilfert & Jiggins 2010). According to the Red Queen hypothesis, each partner of this couple is in constant antagonist coevolution where pathogens evolve new arms to colonize the host, who in turn develop new features to counteract them. In a stable environment, this arms-race can lead to a balance that prevents one taking advantage over the other. However, global change has the potential to disturb this power relationship. Rapid environmental change can favor pathogens that have shorter generation times than hosts, and thus may adapt to new conditions more quickly whereas the hosts are weakened by them. Among new stressors, global warming is an important factor implicated in the emergence of disease (Harvell et al. 2002; Cheng et al. 2004), with adverse consequences for biodiversity. Many pathogenic bacteria grow preferentially in warm seawater, which can lead to an increase in the prevalence of disease with increasing temperature (Vezzulli et al. 2012; Lee et al. 2001). Increasing temperatures can also be detrimental to the immune system of invertebrate hosts thereby facilitating infection by a pathogen. For example, temperature increase leads to a reduction in phagocytosis and phenoloxidase in *Haliotis diversicolor* infected with *Vibrio parahaemolyticus* (Cheng et al. 2004). Similarly, temperature increase leads to a reduction in phagocytosis and superoxide dismutase activity, while an increase in total haemocyte count is observed in the hard clam *Chamelea gallina* (Monari et al. 2007). Rising global temperatures can therefore affect both pathogen and host, potentially generating more favorable conditions for disease.

The onset of massive mortalities of the European abalone *Haliotis tuberculata* is a compelling example of the de-stabilizing effects of environmental change on host-pathogen interactions. Since 1997, recurrent abalone mortality events of 50 to 90% have been

attributed to the bacterium *V. harveyi* (Nicolas et al. 2002). Field observations and laboratory studies of the disease etiology point to increasing water temperatures as the main cause of the disease. The first known mortalities were reported between Le Trieux and Saint-Malo, where summer temperatures are among the highest in northern Brittany, France (Thébault 1998). Subsequent disease outbreaks were limited to areas where summer temperatures exceeded 17.5°C (Huchette & Clavier 2004). In support of these field observations, experimental infections showed that *V. harveyi* was only able to cause death by septicemia when water temperatures exceeded 17°C during the spawning period of *H. tuberculata* (Travers, Basuyaux, et al. 2009). In addition to temperature, gonadal maturation and spawning of *H. tuberculata* were found to be linked with immune depression characterized by a decrease in phagocytosis and phenoloxydase activity leading to greater susceptibility to the disease (M.-A. Travers, Le Goïc, et al. 2008). Other external stressors have also been found to lead to immune depression rendering *H. tuberculata* susceptible to disease (Cardinaud, Offret, et al. 2014). However, while the combined effects of higher temperature and gametogenesis are required to trigger an infection in *H. tuberculata*, below 18°C, *V. harveyi* did not cause mortality in mature abalones (Travers, Basuyaux, et al. 2009), showing that temperature remains a key factor for the existence of the disease.

Given the rapid increase of sea surface temperatures (Collins et al. 2013) and the threat that it represents regarding the evolution of host-pathogen interactions, understanding whether and how marine organisms can defend themselves is of great concern. In the case of *H. tuberculata* infected with *V. harveyi*, the abalone immune system is rapidly affected by the pathogen, as already in the early stages of disease, phagocytosis, the haemocyte density and the production of reactive oxygen species are negatively impacted (Cardinaud et al. 2015). Moreover, *V. harveyi* can inhibit phagocytosis by inactivating p38 MAP kinase (Travers, Bouffant, et al. 2009), avoiding the host immune system. While *V. harveyi* appears well-equipped to attack its host, less is known about the potential ability of *H. tuberculata* to defend itself against *V. harveyi*, and whether resistance to the disease exists. A successive infection experiment conducted on farmed abalone that aimed to select resistant individuals and identify potential effectors of resistance found that survivors over-expressed several genes implicated in metabolic regulation (Travers et al. 2010). Because coping with stress such as gametogenesis and bacterial infection has an

energetic cost, resistance to disease may therefore, be associated with individual or populational differences in metabolism and/or energy allocation strategies.

In the natural environment, recurrent mortality can select for disease resistance. In the black abalone *Haliotis cracherodii*, resistance against a rickettsial disease was found in the population of San Nicolas Island, which was historically the most impacted by the disease (Friedman et al. 2014). With respect to *H. tuberculata*, contrasting mortalities have been observed in natural populations in France, raising the question of whether resistant populations can be found in areas highly impacted by the disease. Identification of a population tolerant or resistant to the disease could allow resistance factors to be identified.

An additional feature of the invertebrate immune system that can lead to an improved response against a pathogen is immune priming. Immune priming is an adaptive response of the immune system which provides protection in a similar way to the immune memory of vertebrates, but via different biologic mechanisms (Kurtz 2005). Invertebrate immune priming has been observed to be either a specific recognition of a pathogen that then leads to a faster and more intensive immune response at a second exposure (Kurtz 2005) or a sustained non-specific immune response following a first infection (Portela et al. 2013). In certain species, the enhanced immunity stimulated by priming can be transmitted to the next generation, providing an important advantage to the host in the context of emergent diseases (Moret 2006). Immune priming, if present in *H. tuberculata*, could be an important defense against *V. harveyi*.

The main objectives of this study were (1) to examine the existence of a population of *H. tuberculata* resistant to *V. harveyi* infection; (2) to compare the immune responses of different natural populations during successive exposures to the pathogen, in order to explain differences in tolerance to the disease and (3) to investigate a potential immune priming response of *H. tuberculata* against *V. harveyi*.

2. Methods

2.1 Abalone and bacterial strains

In order to identify populations with different susceptibilities to the disease, abalones were sampled in an area that has been recurrently impacted by the disease (Saint-Malo) and

in a non-impacted area (Molène). Individuals from the two abalone populations were supplied by local commercial fishermen in May 2014: Saint-Malo (weight 84.5 ± 14.3 g; shell length 83.1 ± 7.6 mm) and Molène (weight 82.5 ± 19.1 g; shell length 84.2 ± 4.4 mm). Abalones from the two populations were kept separate, but under the same controlled conditions for approximately five months and fed with *Palmaria palmata* ad libitum. During this period, the two populations received the same circulating water and the temperature was controlled such that the two populations reached maturity at the same time and as close as possible to the first infection (1300 degree-days). Abalones were transferred to infection tanks two weeks before the start of experimentation (September 2014). The temperature was set to 17°C ten days before experimentation and then increased to 18°C four days before the infection, in order to prevent uncontrolled bacterial proliferation prior to the experiment. Dead abalones were counted and removed twice daily.

The bacteria used for the challenge is a virulent strain of *Vibrio harveyi* (ORM4) isolated from diseased abalone in Normandy, France during an episode of massive mortalities in 1999 (Nicolas et al. 2002). Bacteria were grown in Luria-Bertani Agar supplemented with salt (LBS) at a final concentration of 20g.l^{-1} during 72 hours at 18°C. Prior to use in the experiment, bacteria were washed with filter-sterilized seawater (FSSW) and quantified by optical density measurements at 490 nm. For the post-infection analyses, a modified mother strain of ORM4 was used: a kanamycin resistant strain, tagged with green fluorescent protein (GFP) (M.-A. Travers, Barbou, et al. 2008).

2.2 Bacterial challenge

Abalones were challenged by two successive infections by immersion separated by a period of four weeks including three weeks of rest. They were placed in 100 L tanks in a closed system, supplied with seawater maintained at 18°C with a summer photoperiod (16h day/8h night) for a number of 22 abalones per tank. For each of the two populations, two conditions were performed in triplicate: a control condition with no bacterial exposure and another condition exposed to 10^4 CFU.ml⁻¹ of *V. harveyi* during 24 h. After the 24 h exposure, water in all the tanks was renewed at 100%, with subsequent water renewals of 50% taking place each day for the remainder of the infection. A second infection was performed with the surviving abalones 28 days after the first exposure, following the same protocol. During

the infection periods, abalones were not fed, but feeding with *P. palmata* resumed during the three-week rest period between the two infections. Dead abalones were counted and removed twice daily. The second infection was followed for one week. After this period, all surviving infected abalones and uninfected (control) abalones were kept for an additional two months at 18°C with a summer photoperiod and fed with *P. palmata* for post-infection analyses.

2.3 Sampling of abalone hemolymph and tissues

In order to compare the immune response of the two populations at different time intervals of the disease and between the first and the second infection, live abalone were sampled at 1, 3 and 5 days after the first infection and at 0 (just before exposure), 1 and 3 days after the second infection. Particular attention was given to not sample moribund abalones. For the second infection, sampling at 1 day was only possible for the Saint-Malo population because mortality in the Molène population was too high, and the number of animals remaining was insufficient for 3 sampling points. For each sampling time point, three abalones were taken from each replicate tank. Approximately 5 mL of hemolymph was collected from each animal with a sterile syringe. 300 µL of hemolymph were used immediately for *in vitro* phagocytosis and total haemocyte count, 500 µL was frozen at -20°C for the detection of *V. harveyi* by qPCR. All animals were dissected to collect the gills which were frozen in liquid nitrogen immediately.

2.4 In vitro phagocytosis index, viability and Total Haemocytes Count (THC)

Freshly collected hemolymph was used immediately for quantifying phagocytosis, total haemocyte count (THC) and viability by flow cytometry. Three technical replicates were run for each biological replicate.

2.4.1 Viability index and THC

50 µL was diluted in 150 µL of AASH supplemented with 1% of Sybr Green fluorescent dye and 1% of propidium iodide fluorescent dye in a 96-well round-bottom plate. After 20 min incubation at room temperature, the plate was analyzed by flow cytometry. While Sybr Green binds to all nucleic acids present in the sample, and is measured by green

fluorescence, propidium iodide can bind only to dead cells that have suffered loss in membrane integrity and is measured by red fluorescence. The THC value was obtained by the number of events showing a green fluorescence divided by the flow rate. The viability index was determined as the percentage of haemocytes which did not show red fluorescence.

2.4.2 Phagocytosis index using fluorescent beads

50 µl of hemolymph was diluted in 100 µl of FSSW and distributed in a 96-well round-bottom plate. Haemocytes were allowed to adhere for 15 min, followed by the addition of 50 µl of 2.00 µm fluorescent beads diluted 1:100 in distilled water (Fluoresbrite YG Microspheres, Polysciences) (M.-A. Travers, Le Goïc, et al. 2008). After 1 h incubation at 18°C, the supernatant was removed and 50 µl of trypsin (2.5 mg.ml⁻¹) in an anti-aggregating solution (AASH: 1.5% EDTA, 6.25 g L NaCl, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) was added to detach the cells from the bottom of the wells. After 10 min of shaking at the maximum speed on a Titramax 100 plate shaker (Heidolph), 150 µl of AASH was added and the plate was analyzed by flow cytometry with the Guava EasyCyte Plus (Merck Millepore). Beads were identified by their green fluorescence and the phagocytosis index was defined as the percentage of haemocytes phagocytosing three or more beads.

2.4.3 Detection of *V. harveyi* in hemolymph and gills by real-time quantitative PCR

DNA was extracted from 500 µl total hemolymph, and from 30 mg of gill tissue using the QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. Hemolymph samples were centrifuged at 10 000g for 10 min. Pellets containing bacteria and haemocytes were digested during 2 h with ATL buffer supplemented with 20 µl proteinase K. Frozen gills were ground with a MM400 mixer mill (RETSCH) and kept frozen using liquid nitrogen. After all subsequent steps of the standard protocol, the columns were eluted twice, first with 150 µl of DNase free water, then with 50 µl. In order to quantify *V. harveyi* in hemolymph, a standard curve was obtained with 10-fold serial dilution in FSSW of *V. harveyi* bacterial culture, ranging from 10⁸ to 0 CFU. In order to obtain a standard curve for gill tissue, bacterial culture was mixed with uninfected gill tissue homogenate in order to extract DNA under the same conditions as infected gill tissue. A 10-fold serial dilution of bacterial culture

from 10^7 to 0 CFU were added to an uninfected abalone gill homogenate of 30 mg.ml⁻¹. Bacteria concentration was estimated using a Malassez counting chamber under light microscopy.

The concentration of *V. harveyi* was quantified by qPCR using the LightCycler 480 Probes Master chemistry on a LightCycler 480 thermocycler (Roche). Amplification of the *V. harveyi* *tox-R* gene was done with the following specific primers: ToxR F1 CCA-CTG-CTG-AGA-CAA-AAG-CA and ToxR R1 GTG-ATT-CTG-CAG-GGT-TGG-TT. Fluorescent visualization of amplification was done using a *tox-R* probe dually labeled with the Texas Red 5' reporter dye and the BHQ-2 downstream 3' quencher dye: CAG-CCG-TCG-AAC-AAG-CAC-CG (Schikorski et al. 2013). Each PCR reaction was run in triplicate, containing 5 µl of DNA, 600 nM of each primer, 200 nM of probes and 7.5 µl of master mix, for a final volume of 15 µl. Thermal cycling consisted of an initial pre-incubation step at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing and extension at 58°C for 1 min and 30 s, the fluorescence reading at each cycle at 72°C for 1 second. The thresholds were set using LightCycler 480 software V 1.5 (Roche). The primer efficiency was determined by the slope of the standard curves using the equation $E = 10^{(-1/\text{slope})}$.

2.5 Post-infection analyses

Abalones surviving the experimental infections (from the Saint-Malo population) and uninfected (control) abalones (from both Saint-Malo and Molène) were used for several additional analyses. No survivors remained for the Molène population after two successive bacterial challenges. Additional analyses included: (1) 3D microscopy of intracellular uptake of *V. harveyi* by abalone haemocytes, (2) impact of extracellular products of *V. harveyi* on phagocytosis, and (3) the impact of abalone serum on bacterial growth. To minimize stress each individual was sampled for hemolymph only once.

2.5.1 3D Microscopy of phagocytosis

Because the methods in flow cytometry used here cannot distinguish whether bacteria are adhered to the surface of a haemocyte or are internalized into the haemocyte, intracellular uptake of *V. harveyi* by abalone haemocytes was confirmed by 3-dimensional fluorescence microscopy for abalone from both Saint-Malo and Molène. Freshly collected

hemolymph was diluted ten times in FSSW (100µl) and allowed to adhere for 15 min on a glass slide. The supernatant was removed and replaced by a GFP *V. harveyi* suspension (M.-A. Travers, Barbou, et al. 2008) to obtain a 50:1 bacteria to haemocyte ratio. After 1h of incubation at 18°C, the supernatant was removed and glass slides were washed twice with Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 before being fixed for 10 min with 3.7% formalin in PBS. After two washing steps with PBS, glass slides were covered by 100 µl of a dilution of methanolic stock solution of rhodamine-phalloidin R415 (Invitrogen) with PBS for 20 min, in order to label the actin of cytoskeleton, washed again in PBS, and covered with 100 µl of 4', 6-diamidino-2'-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) at 0.1 µg.ml⁻¹ (Thermo Scientific) for 5 min, to label the nucleus. Finally, the slides were washed with PBS before observation. Slides were observed on an Axio Observer Z1 complemented by the 3D Vivatome module (Carl Zeiss AG). Lasers were used at λ_{ex} 494nm \pm 20 for GFP (λ_{em} 436 \pm 40), λ_{ex} 406 nm \pm 15 for DAPI (λ_{em} 457 \pm 50), and λ_{ex} 575 nm \pm 25 for rhodamine-phalloidin (λ_{em} 628 \pm 40). In order to obtain a 3-dimensional image, series of 14 optical cross-sections of 0.8µm were collected and compiled. The images were processed with the AxioVision V 4.8 software (Carl Zeiss AG).

2.5.2 Impact of extracellular products of *V. harveyi* on phagocytosis of GFP-labelled bacteria

Bacterial extracellular products (ECPs) were produced by the cellophane overlay method (Liu 1957). Luria Bertani agar plates were covered with sterile cellophane films, and then 2 ml of approximately 10⁹ *V. harveyi* culture was transferred to the top of the cellophane and incubated at 18°C for 72h. The bacteria and their ECPs were recovered by successive rinsing with 4 ml of FSSW. The ECP/bacteria suspension was centrifuged at 10000 g for 30 min, and the supernatant containing ECPs was recovered and filtered at 0.2 µm. ECP concentration was measured by the Bradford method (Ramagli 1999), with serum albumin as the standard. Phagocytosis of GFP-labelled *V. harveyi* was measured in the presence of two concentrations of ECPs: 15 and 30 µg.ml⁻¹, and a positive control of FSSW containing no ECPs (0 µg.ml⁻¹). Flow cytometry was performed on the Guava EasyCyte Plus (Merck Milipore). Phagocytosis values were represented by the mean of green fluorescence following the protocol described in Pichon et al. (2013), using 1 hour incubation.

2.5.3 Impact of abalone serum on bacteria growth

The ability of *V. harveyi* to grow in the serum of abalone from Molène and from Saint-Malo was tested using two strains: the virulent ORM4 and the non-virulent strain LMG 7890 (Travers, Bouffant, et al. 2009). For each abalone population, 1 ml of hemolymph from 5 individuals was pooled, and then centrifuged at 200 g for 10 min in order to recover only the serum, followed by filter-sterilization at 0.2 µm. Measurements of both ORM4 and LMG 7890 growth were done in 100-well flat-bottom plates with a computer-controlled incubator/reader/shaker, the Bioscreen C MBR. 150 µl of serum and 50 µl of bacteria suspension in LBS ($4 \cdot 10^4$ cells.ml⁻¹) were pipetted into each well. In order to have a stable control against which to compare bacterial growth in the serum of abalone from Molène and Saint-Malo, a positive control of growth was performed for both strains by adding 50 µl of bacteria suspension with 150 µl of LBS. A negative control was performed by adding 50 µl of sterile LBS with 150 µl of serum. Each condition was performed in triplicate. The plate was incubated at 18°C for 42 hours and the absorbance at 492 nm was measured at intervals of 30 min. The bacterial concentration was calculated with the following formula: $6 \cdot 10^9 \times OD + 2 \cdot 10^8$ (Travers et al. 2008). The maximum growth rate for each condition was obtained by calculating the slope of the bacterial exponential growth phase from a plot of the natural logarithm of bacterial abundance versus incubation time.

2.6 Statistical analysis

The survival rate of infected and uninfected abalone from Saint-Malo and Molène was computed with a Kaplan-Meier estimate followed by a log-rank test in the R “survival” package (Therneau 2015). Phagocytosis and THC data were fitted on a linear mixed effects model with the factor tanks as random effect, followed by a pairwise comparison of the least-squares means between uninfected and infected treatments. The effects of ECP on phagocytosis for each population were estimated by a 2-way nested ANOVA. As the hemolymph of each individual was used to quantify phagocytosis under three concentrations of ECPs (conditions 0, 15 and 30 µg.ml⁻¹), individuals were considered as repeated factors. Then pairwise comparisons of the least-squares means between ECP treatments were performed. Finally, a logistic regression model was used to investigate the link between the phagocytosis index and the probability of abalone to be positive for *V. harveyi*; and to evaluate if there were differences in the probability of being positive for *V.*

harveyi for abalone originating from Saint-Malo or Molène. In all tests, at the significance threshold was set to $\alpha = P < 0.05$. All statistical analyses were performed using the software R (version 3.2.3)(R Core Team 2015).

Results

3.1 Differential survival of abalone following *V. harveyi* infection in Saint-Malo and Molène

The survival of abalones was measured in order to observe differences in resistance to infection with *V. harveyi* between the two populations. Indeed, during the first infection, the population of Molène suffered great mortalities whereas the population of Saint-Malo exhibited very little mortality. After the last observed mortality (24 days after the first exposure), the survival rate was 0.512 for Molène and 0.953 for Saint-Malo (Fig. 1). Survival for the Saint-Malo population was not significantly different from the uninfected controls ($P=0.765$). The log-rank test showed a significant difference in survival between the two infected populations ($P<0.001$). Survival was quantified only until 7 days after the second exposure, and by this time point no additional mortality was observed.

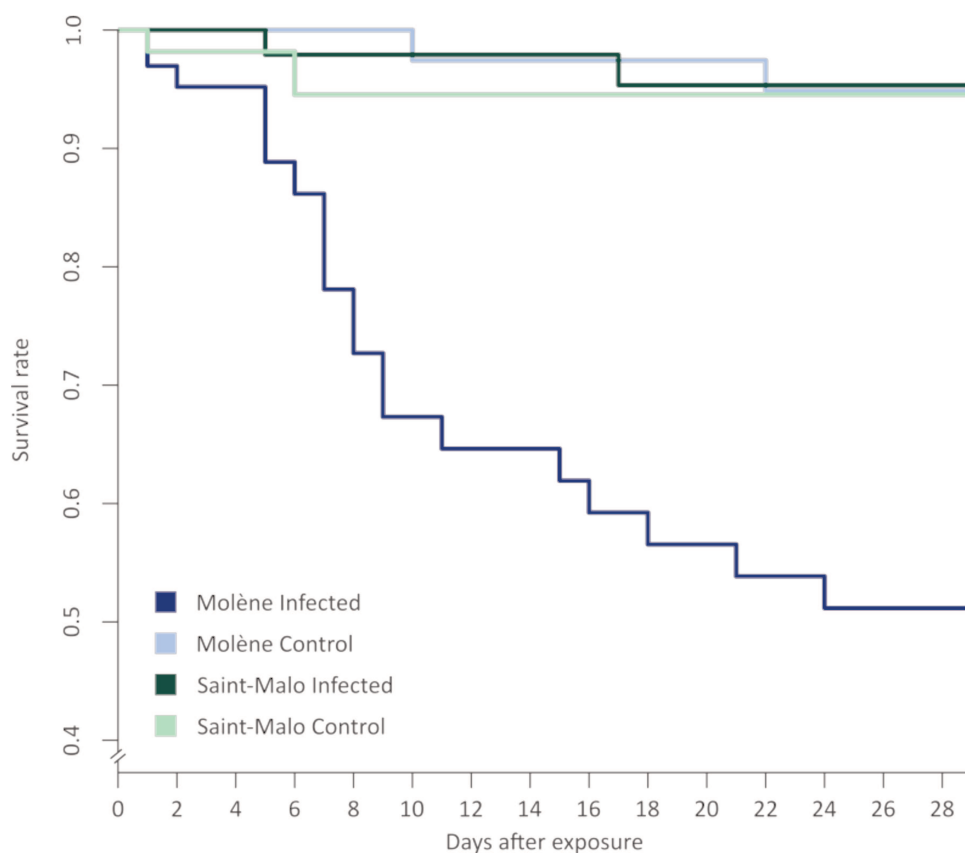


Figure 1 : Kaplan-Meier survival rate following the first exposure of the two populations to 10^4 bacteria/mL during 24 hours at 18°C.

3.2 THC and Viability during the successive infections

Total haemocyte count (THC) and haemocyte viability were measured for individuals from Saint-Malo and Molène. Whereas no significant differences in THC were observed in abalones from Saint-Malo across all time points, abalones from Molène exhibited a significant increase in THC after 24h of exposure (Fig. 2). A slight decrease of THC was observed during the second infection for abalones from Saint-Malo but was not significant ($P=0.0947$). No change was detected in the viability of haemocytes during the successive infections in both populations. The mean of haemocyte viability was $98.44 \pm 0.09\%$ across all individuals measured.

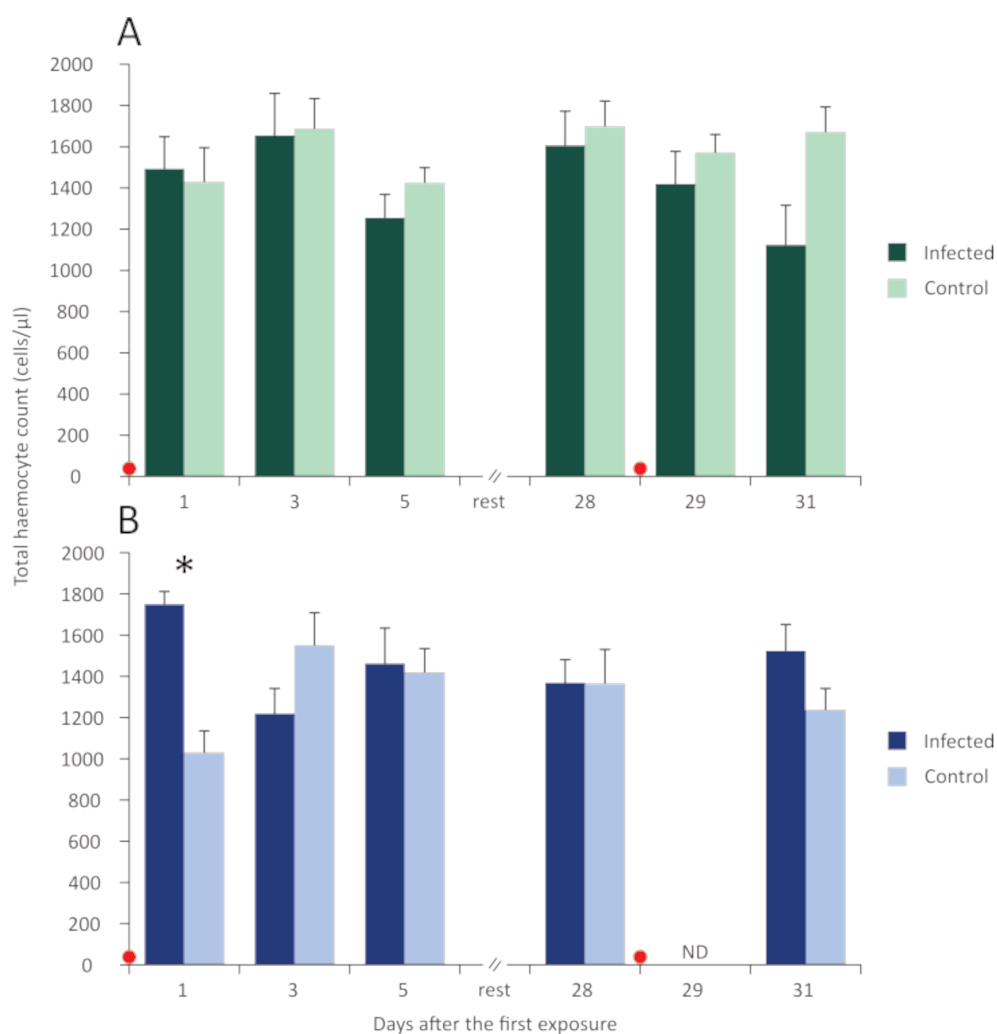


Figure 2: Total haemocytes count (THC) during the two exposures of (A) Saint-Malo and (B) Molène. Red dots indicate the exposures. ND indicates that no data is available. * indicates values that are significantly different from the control for a pairwise comparison of the least-squares means ($p < 0.05$).

3.3 Phagocytosis index during the successive infections

A significant decrease in the phagocytosis index was observed 1 day after the first exposure to *V. harveyi*, of 36% for Molène and 40% for Saint-Malo, relative to the uninfected abalone (Fig. 3). By 2 days, the phagocytosis index of infected abalones recovered to the level of the uninfected controls and remained at the level of the controls until 5 days post-infection. Just prior to the second exposure, no significant difference in the phagocytosis index was observed between infected abalone and uninfected controls for the two populations. During the second infection, no reduction in phagocytosis was observed in the infected abalones from Saint-Malo and the level of phagocytosis was not significantly different than that of uninfected controls until the end of the experiment. In contrast, abalone from Molène showed a significant decrease in phagocytosis 5 days after the second exposure. (Fig. 3)

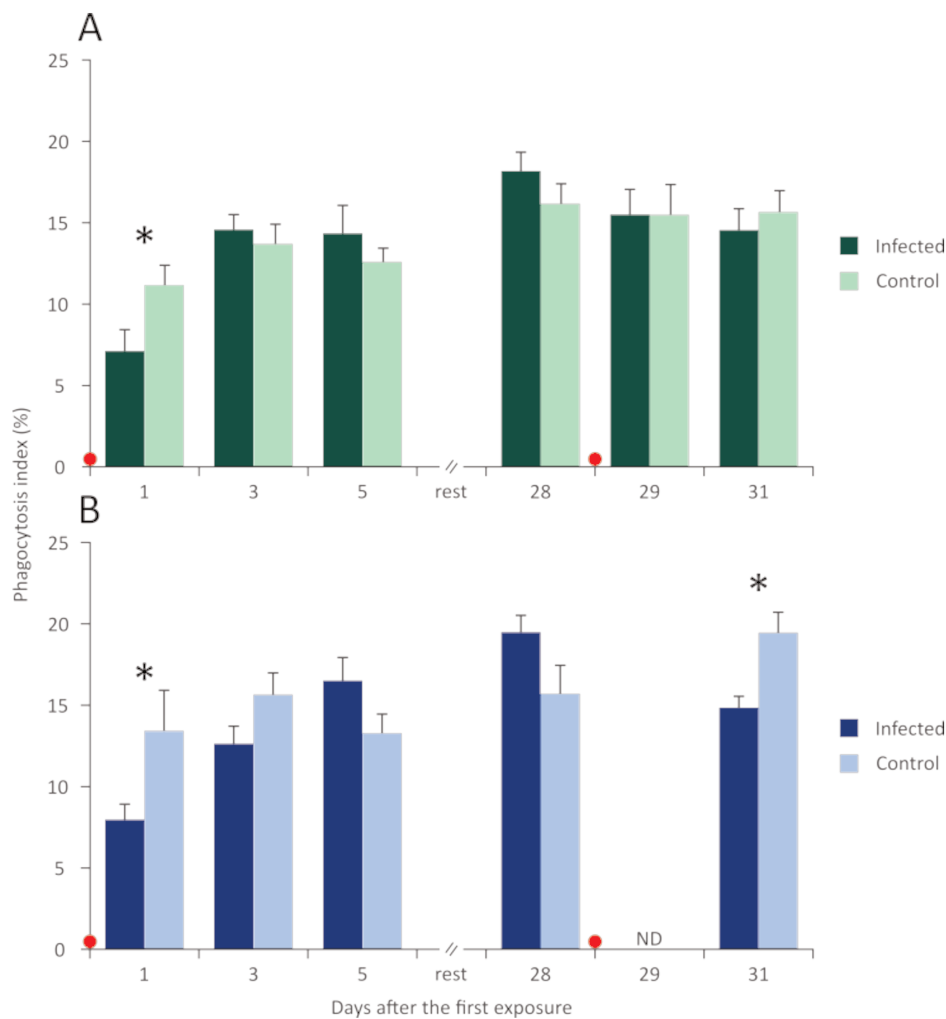


Figure 3: Phagocytosis index based on micro-beads engulfment (percentage of haemocytes containing three or more fluorescent beads relative to total haemocytes) during two successive infections of abalone from (A) Saint-Malo and (B) Molène. Red dots indicate the timing of bacterial exposure. ND indicates that no data is available. * indicates values that are significantly different from the control for a pairwise comparison of the least-squares means ($p < 0.05$).

3.4 Detection of *V. harveyi* in hemolymph and gills by qPCR

The sensitivity threshold of qPCR was estimated to be $7.5 \cdot 10^2$ bacteria/ml of hemolymph and $2.5 \cdot 10^2$ bacteria/30 mg of tissue for gills. *V. harveyi* was detected in the gills of 20 individuals and in the hemolymph of 7 individuals (fig. 4). The concentration of bacteria was in the range of $5.51 \cdot 10^2 \pm 57$ bacteria/30 mg of gills and $6.4 \cdot 10^3 \pm 2.02 \cdot 10^3$ bacteria/ml of hemolymph. One individual showed $1.8 \cdot 10^4$ bacteria/ml of hemolymph, which explains the high standard deviation for this compartment (the average without this outlier individual was $4.52 \cdot 10^3 \pm 7.23 \cdot 10^2$ bacteria/ml of hemolymph). As the concentration of *V. harveyi* was near the detection threshold for most samples from which *V. harveyi* was detected, the detection results were treated as positive or negative for the presence of the bacterium. A binomial logistic regression was used to treat these results.

In the hemolymph, very few individuals were detected as positive for *V. harveyi*: 4 infected abalones from Molène and only 1 from Saint-Malo across all time points combined. Two uninfected control individuals (one in each population) were also detected as positive. *V. harveyi* was detected in the gills of a greater number of individuals: 15 positives in Molène and 5 in Saint-Malo with *V. harveyi* being detected in 1 uninfected control in the Molène population. The time points which exhibited the greatest number of positives were 1 day and 5 days after the first exposure. For all time points, the proportion of positive individuals was greater for Molène than for Saint-Malo. A logistic regression was consequently performed only on the infected abalones by taking into account 3 explanatory factors relating to the probability of abalones to be positive for *V. harveyi* on the gills: the phagocytosis index, the THC and the populations. All three factors significantly influenced the odds of abalone being positive for *V. harveyi*, with the odds of an abalone being positive for *V. harveyi* being 12.9 times higher in abalones from Molène.

Table 1 : Logistic regression examining the effect of the population(pop), the phagocytosis index (phago) and the total haemocytes count (THC), on the proportion of abalones positive to *V. harveyi* on the gills. (*) For THC, the estimate and odds ratio are calculated for an increase of 500 cells/ μ L.

Coefficients:						
	Estimate	odds ratio	std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	-5,02786	0,00655282	2.19997	-2.285	0.02229	*
pop	2,55707	12,8979708	0.80107	3.192	0.00141	**
phago	-0,17121	0,8426446	0.07558	-2.265	0.02350	*
THC (*)	1,30651	3,69326171	0.50927	2.565	0.01030	*

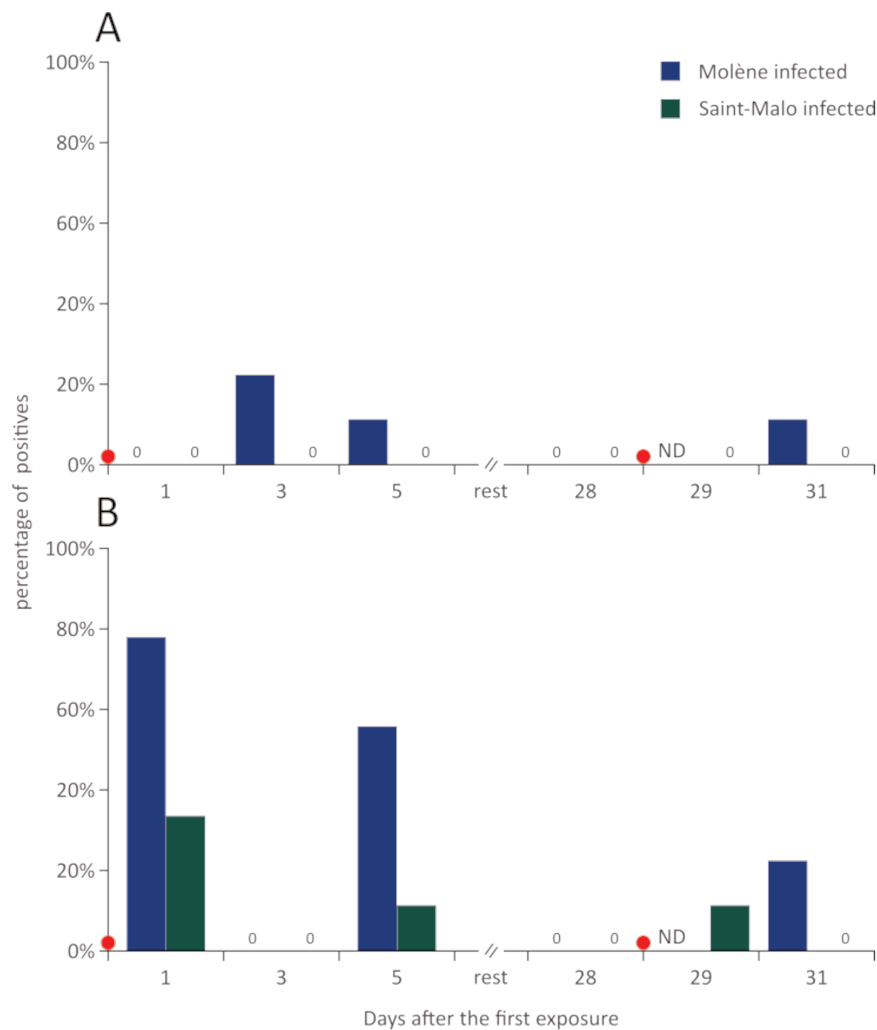


Figure 4: Percentage of positive individuals for *V.harveyi* (n=9) in (A) haemolymph and (B) gills obtained by qPCR using specific primers and a TaqMan probe. The number 0 indicates that no individuals were found as positive at a given population and time point. Red dots indicate the timing of bacterial exposure. ND indicates that no data is available.

3.5 Post-infection analyses:

3.5.1 Fluorescence microscopy of phagocytosis

In order to validate that *V. harveyi* is internalized rather than adhered externally to abalone haemocytes, 3-dimensional fluorescence microscopy was carried out using individuals from Saint-Malo and Molène. Three-dimensional fluorescence microscopy shows that *V. harveyi* is well phagocytosed by the haemocytes of *H. tuberculata* from the two populations. In Fig 5, the nucleus of the haemocyte is shown in blue and its cytoskeleton, delimiting the plasma membrane of haemocytes, is shown in orange. The green points observed to the left of the nucleus and within the cell membranes correspond to GFP-

labelled *V. harveyi* located inside the cell. The flanking panels (Fig. 5 A, C), showing cross-sections of the haemocyte along the z- and x-axes, confirm that bacteria are inside haemocyte cells and not merely at the surface. Similar images were obtained using haemocytes from individuals from both Saint-Malo and Molène.

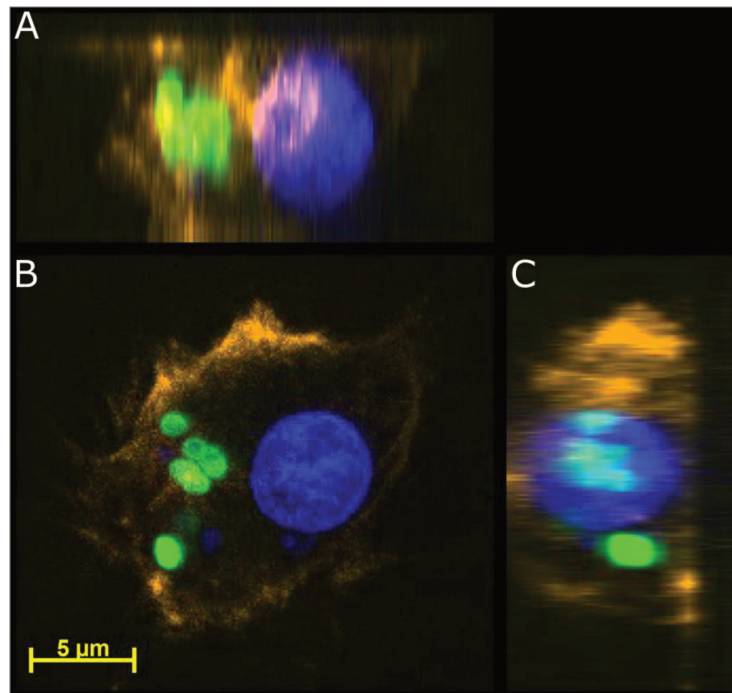


Figure 5: 3-dimensional fluorescence microscopy (x60) pictures of a haemocyte (cytoskeleton in orange and nucleus in blue) which has phagocytosed GFP-labelled *V. harveyi* (green). The central picture (B) shows a reconstruction of 14 stacked fluorescence images. The flanking pictures show cross-sections compiled along the (A) z-axis and (C) x-axis.

3.5.2 Effect of the *V. harveyi* ECPs on the capacities of abalone to phagocyte this bacteria

Haemocytes of abalones from each population were exposed to 0, 15 and 30 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ of ECPs obtained from the ORM4 strain of *V. harveyi*. Phagocytosis of GFP-labelled *V. harveyi* under exposure to ECPs was quantified two months after the successive infections experiment (Fig. 6). A nested ANOVA showed no significant differences between the Saint-Malo and Molène populations, but the factor ECPs exhibited a significant p-value < 0.001. Thus, pairwise comparisons of ls-means were performed within each population in order to evaluate their responses to ECPs treatments. A concentration of 30 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ECPs showed a significant negative effect on the phagocytosis index of uninfected individuals, with an inhibition of phagocytosis of 19% for abalone from Molène and 22.8% for Saint-Malo.

Abalones from Saint-Malo having survived the successive infections showed no significant difference in phagocytosis when exposed to 0, 15 and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of ECPs.

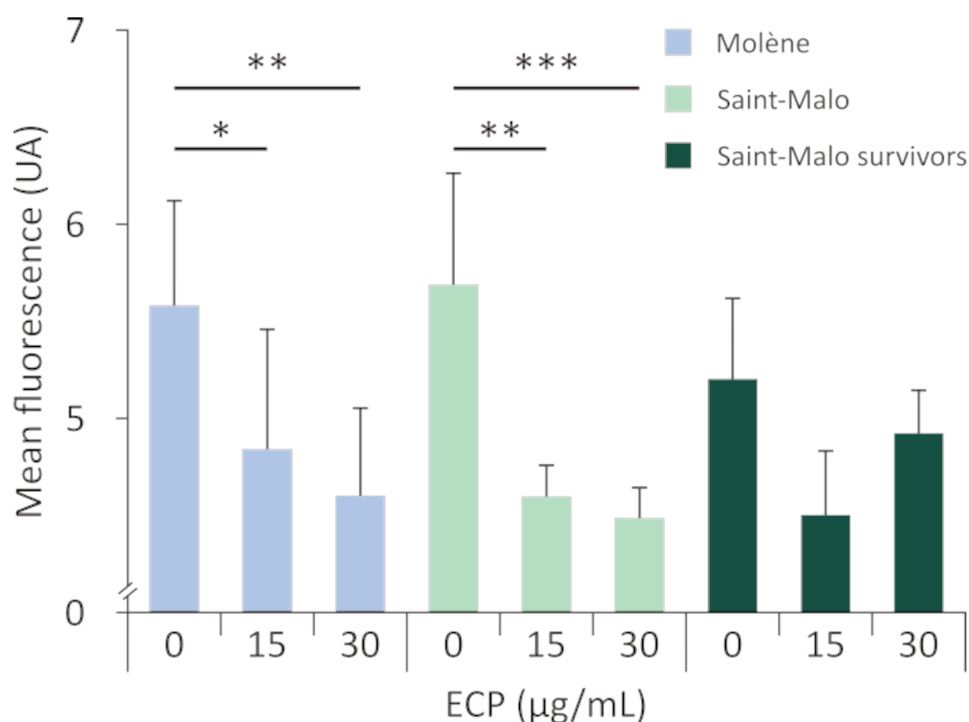


Figure 6: Impact of two concentrations of extracellular products of *V. harveyi* (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on phagocytosis of GFP-labelled bacteria. Values are the means of green fluorescence emitted by haemocytes. * indicates values that are significantly different from condition without ECPs for a pairwise comparison of the least-squares means (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3.5.3 Ability of *V. harveyi* to grow in acellular fraction of abalones hemolymph

The growth of two strains of *V. harveyi* (LMG7890 and ORM4) in the acellular fraction of the hemolymph from abalone of Saint-Malo and Molène were followed during 42 hours (Fig. 7). In order to have the necessary volume of serum, hemolymph of five individuals was pooled for each population. The two bacterial strains tested began their growth at approximately 2-3 hours earlier than in LBS, the positive control. Growth rate was faster in the pathogenic strain (ORM4) relative to the non-pathogenic (LMG7890). Moreover, the ability of *V. harveyi* to grow in abalone serum was lower in Saint-Malo (86% of the maximum growth rate observed in LBS for uninfected abalone and 92% for survivors), while the growth rate in the serum of abalone from Molène was nearly the same as in the LBS positive control (101% of the rate observed in LBS).

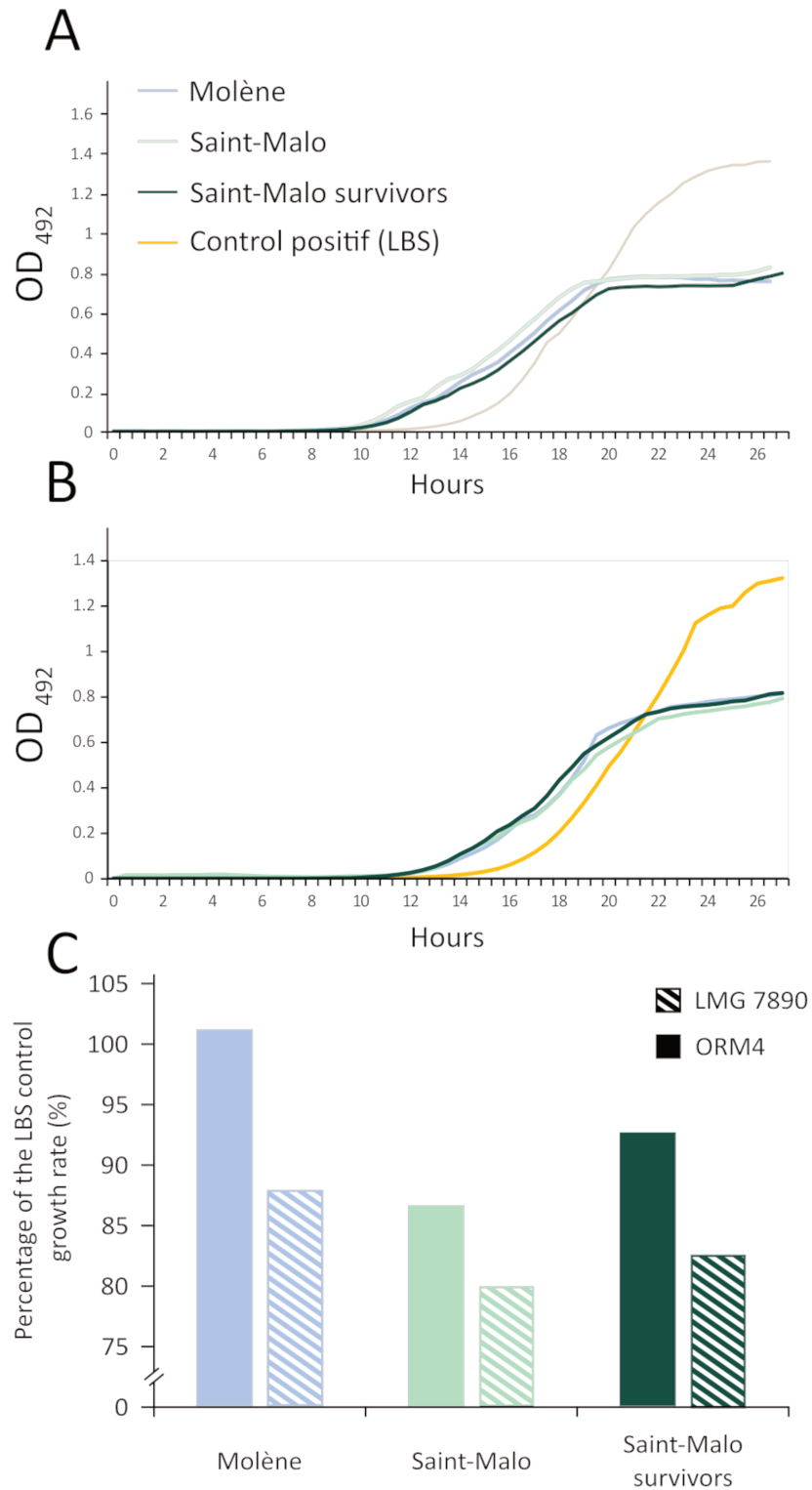


Figure 7: Growth curves of the (A) non-virulent strain LMG7890 and (B) the virulent strain ORM4 in the serum of abalones. The growth of the bacteria in LBS was used as a positive control. (C) Growth rate of the LMG7890 and ORM4 strains in abalone serum are expressed as a percentage of the maximum growth rate in the LBS control.

3. Discussion

Populations exposed to contrasting environmental conditions and having different disease occurrences can evolve different susceptibilities against a particular pathogen. Based on this hypothesis, two populations of *H. tuberculata* were chosen to examine how response to infection to *V. harveyi* could vary in abalone of different origins. In Saint-Malo, where the average sea water temperatures exceed 17°C during the summer spawning period, conditions are favorable for disease development and indeed, this population has been frequently impacted by disease (Huchette & Clavier 2004). On the other hand, mortality has never been reported in Molène and the surrounding region, where temperatures of 17°C are rarely observed (Thébault 1998). Successive infections conducted with abalones from each of these two natural populations showed marked differences in survival. Following 24 days after a first exposure to *V. harveyi*, a survival rate of 51% was observed for abalone from Molène and 95% for abalone from Saint-Malo (Fig. 1). Interestingly, the survival rate for Saint-Malo was not statistically different from that of uninfected controls. Our experimental infections confirm the hypothesis that abalone from a site that has experienced recurrent mortality (Saint-Malo) shows improved survival following infection with *V. harveyi*. According to Coustau and Théron (2004), resistance is defined as a relative term which indicates that a group exhibits a significantly better ability to prevent infection by a specific pathogen. Thus, all subsequent analyses were performed to identify mechanisms which could explain the resistance to the disease observed in abalone from Saint-Malo.

Differences in survival of *H. tuberculata* following successive infection with *V. harveyi* (10^6 bacteria/mL; 19°C) has been previously observed in farmed abalones (Travers et al. 2010). Survival rate improved from 36% after a first infection to 56% following a second exposure, revealing different levels of resistance to the disease within the farmed population and a better ability to resist a second infection. While reduced mortality in this experiment may have been due to immune priming, the enhanced resistance observed at the second exposure could also be explained as an elimination of susceptible phenotypes following the first infection. In order to isolate a priming effect, improved response to the disease needs to be observed in conditions where potentially susceptible phenotypes are not eliminated at a first infection. Therefore, in the present experiment, mild infection conditions in term of

both temperature (18°C) and bacterial concentration (10^4 bacteria/mL) were used to avoid mortality after a first exposure to *V. harveyi*, which was the case for the Saint-Malo population. Despite these infection conditions, survival was low in the susceptible population of Molène. Thus, these infection conditions allowed on one hand, to discriminate the two populations in term of resistance, and on the other hand, to discern which parameters allowed improved resistance to the disease in abalone from Saint-Malo.

After the first infection with *V. harveyi*, individuals from both Saint-Malo and Molène suffered an important drop in phagocytosis (~40% compared to the control) after the first day of exposure, followed by a recovery of this activity by the third day, showing a similar response between the two populations in cellular immunity during the first infection (Fig. 3). The reduction in phagocytosis index could be explained by the saturation of a high proportion of haemocytes following active phagocytosis of *V. harveyi* in the early stages of exposure, resulting in less efficient bead engulfment by 24 hours post-infection. Alternatively, the observed reduction in phagocytosis could be interpreted as an inhibition of phagocytosis. Previous studies have shown that the ORM4 strain can perturb the MAPK signaling pathway by inhibiting phosphorylation of the p38 MAPK, leading to inhibition of phagocytosis compared to the non-pathogenic strain of *V. harveyi* (LM7890)(Travers, Bouffant, et al. 2009). Moreover, a significant decrease in phagocytosis index 24 hours after exposure to *V. harveyi* is linked with a downregulation of clathrin, a protein involved in endocytosis (Cardinaud et al. 2015). Therefore, the lower phagocytosis index observed is likely due to an inhibition of phagocytosis induced by the pathogen.

Interestingly, no significant decrease in phagocytosis was observed 1 day after the second exposure for abalones from Saint-Malo (Fig. 3A). The response of this population to the second infection can be interpreted as an immune priming effect. The survival rates observed in the control and infected conditions in Saint-Malo were similar, supporting the interpretation that the improved response to an infection can be due to a priming effect rather than an elimination of susceptible phenotypes. For the Molène population, low survival rates following the first infection preclude such interpretation.

Immune priming allows invertebrates to show improved survival to a pathogen following a first infection. This mechanism is now known in several insect species (Wu et al.

2015; Wu et al. 2004; Z. Zhao et al. 2013) and the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Portela et al. 2013; Pinaud et al. 2016). In the marine realm, immune priming was first examined in copepods (Kurtz & Franz 2003). More recently, examples among a few marine molluscs have also been documented: *Chlamys farreri* (Cong et al. 2008), *Mytilus galloprovincialis* (Ciacci et al. 2009) and *Crassostrea gigas* (T. Zhang et al. 2014). In the gastropod *Biomphalaria glabrata*, a species phylogenetically close to *H. tuberculata*, a first exposure to the trematode *Schistosoma mansoni* conferred an immune priming effect which led to complete protection, such that a secondary infection exhibited animals with a parasite prevalence of 0% for primed individuals compared to 100% for unprimed (Portela et al. 2013). In the Pacific oyster *C. gigas*, a more acute and rapid immune response in term of phagocytosis and hematopoiesis was observed after being primed with heat-killed *Vibrio splendidus* 7 days before the infection (Cong et al. 2008). Since phagocytosis is usually the first response of the host against the pathogen, inhibition of this mechanism is a widespread strategy among pathogens to persist inside the host tissues (Allam & Raftos 2015). Early phagocytosis response can then be crucial for the resistance of animals against infection and septicemia. In the case of *H. tuberculata*, the first exposure can act as an immune treatment that prevents future phagocytosis inhibition in abalone, thereby improving the early response to a subsequent exposure. A priming effect could allow the abalone immune system to be stimulated in the field at the beginning of the mortality season, thus enhancing protection for the rest of the critical period.

Because of the importance of the phagocytic response, and its implication in priming effect, this immune mechanism has been further examined. During the experimental infections, host phagocytosis was quantified using fluorescent beads. This commonly used approach (Travers, Bouffant, et al. 2009) shows the activity of haemocytes rather than the actual ability to phagocytose a specific bacterium cell. While actual internalization of *V. harveyi* cells has previously been shown in primary cultured cells of farmed abalone haemolymph and gills (Pichon et al. 2013), 3D fluorescent microscopy was used to confirm that this was the case in the freshly collected haemolymph from abalone from both Saint-Malo and Molène. Fluorescent microscopy shows that GFP-labelled bacterial cells are clearly observed inside the haemocytes, providing unquestionable evidence of internalization of *V. harveyi* by the haemocytes of *H. tuberculata* (Fig. 5) and confirming that subsequent flow

cytometry measurements made with GFP-labelled *V. harveyi* quantifies actual phagocytosis. Phagocytosis of GFP-labelled bacteria performed two months after the infection experiment on uninfected individuals exhibited similar responses between the two populations. Abalones from Saint-Malo and Molène showed the same phagocytosis capacity and the same response to the ECPs. Indeed, the two populations suffer a phagocytosis inhibition of about 20% when exposed to 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of ECPs relative to the 0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ controls (Fig. 6). However, for the abalone from Saint-Malo surviving the successive infections, no statistical difference was observed between phagocytosis index exposed to concentrations of 0 μg , 15 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of ECPs, suggesting a potential long-term priming effect against the inhibition of phagocytosis induced by ECPs. This result indicates that the protection against phagocytosis inhibition induced by the first exposure has persisted for over two months.

Our results are the first to indicate the existence of immune priming in abalones, however, the present study does not differentiate between the two possible types of priming. Immune priming in invertebrates occurs either as a sustained response of immune mechanisms which prevents a subsequent attack, or via a specific response which allows recognition of the pathogen thus inducing a more intensive and rapid immune response (Portela et al. 2013). Future work addressing whether sustained response or specificity of response is present in abalone could further our understanding of how immune priming acts in this species. For example, the injection of heat-killed bacteria could address whether immune priming is a specific response in *H. tuberculata*, as performed with the Pacific oyster (T. Zhang et al. 2014). Enhanced phagocytosis was observed only in oysters injected with heat-killed *V. splendidus*, but not with 4 other species of bacteria, suggesting specific recognition of this pathogen. The injection of heat-killed bacteria would also allow the induction of a more intensive immune effect by delivering higher doses of the pathogen. The infection performed in the present study was weak to avoid mortality, possibly leading to a partial or diminished immune priming response.

Sustained immune response is another possible mechanism of immune priming. The pathogenic strain of *V. harveyi* ORM4 is able to avoid the bactericidal response of abalone through an inhibition of the activity of the p38 MAPK, a MAP kinase which is thought to trigger a number of immune responses such as phagocytosis or the secretion of reactive

oxygen species (Travers, Bouffant, et al. 2009). This kind of virulence has also been shown in other marine models. For example, the secretion of a metalloprotease by *Vibrio aestuarianus*, a pathogen of the Pacific oyster *C. gigas*, inhibits, among other immune parameters, phagocytosis (Labreuche et al. 2010). Proteases secreted by the pathogen are a common mechanisms for the inhibition of phagocytosis, but can be counter-acted by protease inhibitors produced by the host (Armstrong 2006). In the disk abalone *Haliotis discus discus*, three types of clade B serine protease inhibitors are expressed in haemocytes following injection of *V. parahaemolyticus* or of LPS (Bathige et al. 2015). Sustained synthesis of protease inhibitors by *H. tuberculata* may therefore be a possible explanation of the long-term protection against phagocytosis inhibition. Future work quantifying protease inhibitors following successive infections with *V. harveyi* could confirm this hypothesis.

Humoral effectors may also contribute to the resistance of the Saint-Malo abalone to *V. harveyi* infection. Marine invertebrates possess a large set of antimicrobial peptides that can counteract bacterial growth (Tincu & Taylor 2004). Hemocyanin can also have strong antimicrobial activity (Dolashka et al. 2015), while other factors can limit bacterial growth by sequestering or limiting the availability of nutrients such as iron (Doherty 2007). In the European abalone, the onset of growth of the two bacterial strains occurred 2-3 hours earlier in the serum of abalone than the LBS control, irrespective of the population, showing potential activators of bacterial growth may be present in the abalone serum. Moreover, bacterial growth rate was greater for the virulent strain of *V. harveyi* (ORM4) compared to the non-virulent strain LMG 7890 (Fig. 7). However, maximum growth rate of the virulent strain ORM4 was lower in the haemolymph of Saint-Malo compared to Molène, indicating that the serum of abalone from Saint-Malo is less favorable for ORM4 growth. Therefore, resistance to *V. harveyi* in abalone from Saint-Malo may in part be explained by the ability to slow down bacterial growth within the serum. Host fluids can have significant effects in growth and gene expression of bacteria (Staroscik & Nelson 2008; Guo et al. 2009). For example, the pedal mucus of the small abalone *Haliotis diversicolor* has been showed to induce the formation of a biofilm by *Vibrio alginolyticus* and to enhance the density of bacteria (Guo et al. 2009). In the present work, bacterial growth in the serum was measured two months after the successive infections; it is possible that different responses may be observed during infection with *V. harveyi*.

The most striking differences between the resistant and susceptible populations were observed in the detection of *V. harveyi* in the haemolymph and the gills of abalone. In the haemolymph, *V. harveyi* was detected in only 5 individuals, all from the Molène population (Fig. 4A). Despite the low survival rate in abalone from Molène, the small number of individuals positive for *V. harveyi* can be explained by the rapid growth rate of *V. harveyi* in abalone serum (~10 hours, see Fig 7), rendering the time frame to detect the bacteria in hemolymph (between the beginning of exponential phase and septicemia) very short. It is nevertheless interesting to note that all individuals for which *V. harveyi* was detected were from Molène, suggesting that *V. harveyi* is better able to penetrate the haemolymph of abalone from this population. The results of THC support this interpretation. Although no differences in THC were observed between infected abalones and uninfected controls in the Saint-Malo population, abalone from Molène showed a significant increase of the number of circulating haemocytes after 24 hours of exposure to *V. harveyi* (Fig. 2). This likely denotes an inflammatory response by a recruitment of haemocytes in the hemocoel suggesting greater presence of *V. harveyi* in this compartment in abalone from Molène.

Detection of *V. harveyi* in the gills was significantly greater in abalone from Molène compared to Saint-Malo (Fig. 4B), and a binomial regression showed that the detection of *V. harveyi* on the gills was correlated with an increase of THC and a decrease of phagocytosis index (Table. 1). These findings indicate that even if the bacterium is not detected in the haemolymph, its presence in the gills already induces an immune response. The portal of entry of *V. harveyi* is the gills of abalones (Cardinaud, Barbou, et al. 2014), where previous work has shown that bacterial density can be 5-fold greater in the gills compared to other tissues 6 hours after exposure. The small number of individuals which were positive for *V. harveyi* in the gills among abalone from Saint-Malo suggests that an important part of the resistance of this population may depend on the ability to prevent the settlement and penetration of bacteria in the gills. The ability to adhere to the portal of entry of the host can be essential for the virulence of a bacterium. This is the case of *Flavobacterium columnare* and *Yersinia ruckeri*, for which all known virulent strains are able to adhere to the gills of their respective hosts, whereas non-virulent strains cannot (Tobback et al. 2010; Olivares-Fuster et al. 2011). Preventing settlement of bacteria on the gills may be an important defense mechanism against disease. Other strategies can also be used to counteract the

settlement of bacteria on the gills of marine invertebrates, such as the localized production of lysozyme or antimicrobial peptides. In the penaid shrimp *Marsupenaeus japonicus*, lysozyme expression and antimicrobial activity are elevated in the gills (Kaizu et al. 2011). Moreover, an antimicrobial peptide expressed only in gills has been discovered in the abalone *Haliotis discus* (Seo et al. 2016). Since the gills may be important in the resistance to *V. harveyi* infection, future work comparing potential antimicrobial or anti-adherent activity in the gills of abalone from the two populations may help to identify the mechanisms by which abalone from Saint-Malo have enhanced resistance against *V. harveyi*.

Surprisingly, no individuals were positive for *V. harveyi* in the gills 3 days after the first exposure in both populations. This is possibly due to the fact that bacterial concentrations fluctuate over the course of the experimental infection, as was quantified in similar experiments (M.-A. Travers, Barbou, et al. 2008). Thus, bacterial concentrations at this given time point may have fallen below the detection limit.

4. Conclusions

This study shows the differential resistance between the two populations of *H. tuberculata* against *V. harveyi* and the comparisons between these two populations identified a number of resistance effectors. Abalone haemolymph exhibited weak defenses against the bacteria, and are presumably insufficient to contain a septicemia, although phagocytosis and limitation of bacterium growth in the serum are two possible resistance mechanisms. On the other hand, the significant differences observed in detection of *V. harveyi* in the gills point towards an important implication of the gills in the resistance of the Saint-Malo population. Our results show the first evidence of immune priming in *Haliotis tuberculata* and the enhanced capacity of phagocytosis at the second infection demonstrate a potential importance of cellular response against *V. harveyi*. A synergistic interaction among effectors in the gills and haemolymph likely lead to disease resistance. Further work is needed to understand precisely how the population of Saint-Malo resists infection and to find the gills effectors that counteract the settlement of *V. harveyi* in abalone gills.

Acknowledgments

This work was supported by the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir". The authors are grateful to RIERA Fabien; RICHARD Gaelle; HARNEY Ewan; LAISNEY Naïda; PETINAY Stephanie for their help in sampling during the infections experiment, and BIDAULT Adeline her assistance and suggestions for qPCR analyses. Finally, authors are also grateful to all the SMEL team for their help and their warm welcome within their structure.

CHAPITRE 2

ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DE LA RESISTANCE

Introduction de l'article

Les populations d'ormeaux de l'Atlantique nord bénéficient chacune de conditions environnementales très différentes entre elles, en particulier en termes de température. Ces différences de températures ont d'ailleurs joué un rôle déterminant dans la distribution des mortalités causées par *V. harveyi*, donnant lieu à l'observation de mortalités très importantes et répétées chez certaines populations, tandis que d'autres, bénéficiant de température plus faibles ont été épargnées par l'émergence de cette maladie (Huchette & Clavier 2004).

Ces différences de pression de sélection, causées par ces mortalités, peuvent potentiellement mener à l'observation d'une grande hétérogénéité de susceptibilité face à la maladie. C'est à partir de ce postulat que différentes populations ont été sélectionnées en Bretagne et en Normandie en fonction de leur historique concernant la maladie. L'objectif est donc de comparer leurs réponses face à *V. harveyi*, en effectuant des analyses d'expressions différentielles de gènes globales (RNAseq) dans l'hémolymphe d'individus résistants et susceptibles. La comparaison de différents phénotypes extraits de populations naturelles représente un outil idéal pour déterminer les mécanismes pouvant permettre à des ormeaux de résister à la maladie. L'approche de RNAseq est particulièrement appropriée dans ce type de recherche car c'est une méthode sans à priori qui permet d'évaluer la réponse globale du tissu analysé.

Ainsi, trois populations ont été sélectionnées (Figure 9) :

- Saint-Malo : l'une des premières populations à être touchée par la maladie (Nicolas et al. 2002). Les mortalités ont frappé cette population plusieurs années de suite. Aujourd'hui, cette population semble se porter mieux et deux pêcheurs exploitent cette ressource à raison de quotas de pêche de 50 000 ormeaux par an chacun (O. Basuyaux, communication personnelle).
- Bretteville : Cette population se trouve dans une zone où des mortalités importantes ont été observées durant l'été 2004. Suite à cela, quelques épisodes de mortalités partielles ont été observés (Basuyaux & Labrut 2007).

- Molène : Cette population se trouve dans une zone dont les températures sont beaucoup plus faibles. Aucune mortalité importante n'a jamais été observée dans cette zone.

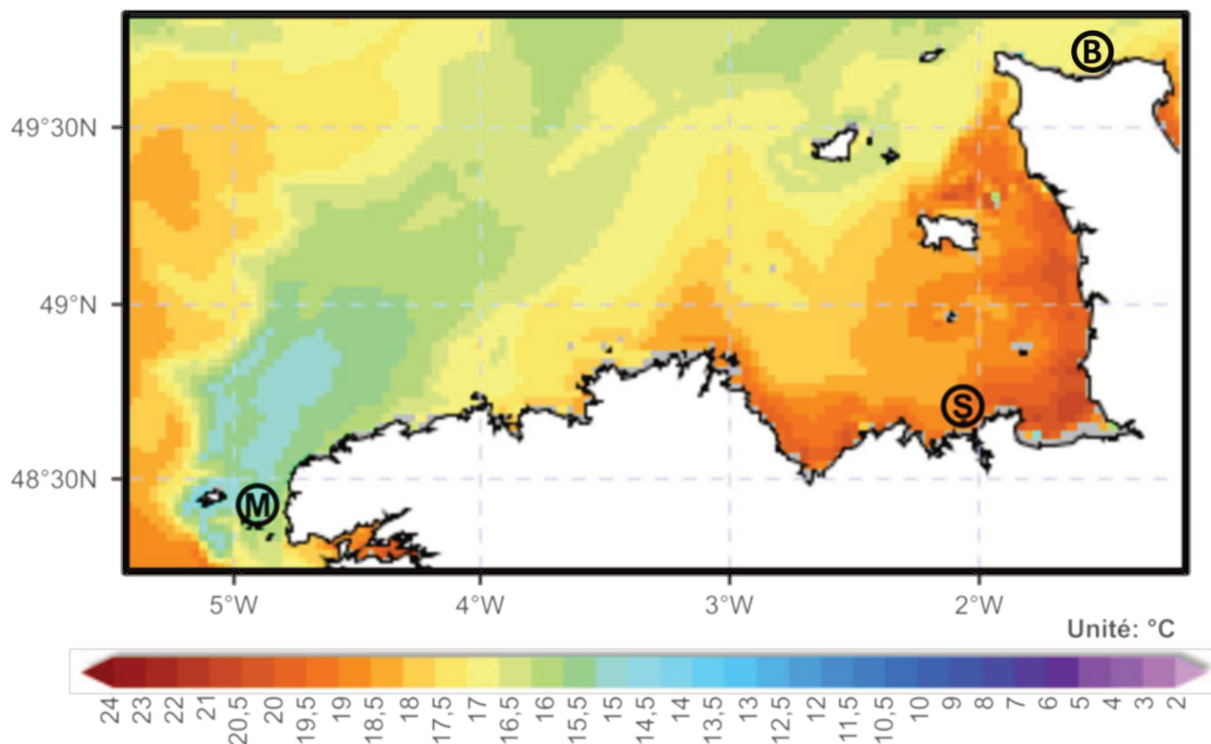


Figure 10: Localisation des populations utilisées pour cette expérimentation : M = Molène ; S = Saint-Malo et B = Bretteville. La carte de température est issue du site internet de modélisation « MARC » (IFREMER) (<https://marc.ifremer.fr/>).

Cette expérimentation a été réalisée selon le même protocole que celui présenté dans le Chapitre 1, concernant le conditionnement des ormeaux de chaque population avant l'infection.

Il faut noter que la résistance d'une population est définie dans cette étude comme un terme relatif à l'observation de mortalité plus faible dans une population comparée à une autre, suite à une infection par *V. harveyi*. Cependant, certains phénotypes sensibles peuvent être présents au sein d'une population globalement résistante. Bien évidemment, le contraire est tout aussi vrai. L'expérimentation présentée ici, ainsi que son plan d'échantillonnage, ont donc été soigneusement réfléchis pour s'assurer que les échantillons prélevés pour les analyses RNAseq soient bien représentatifs d'un phénotype sensible et d'un phénotype résistant (protocole expliqué en figure 1 de l'article 2).

L'article présenté dans ce chapitre est en préparation pour une future publication. Cependant, les données de séquençage obtenues lors de ce travail ont été exploitées conjointement aux données de séquençage du docteur Ewan Harney afin d'effectuer l'assemblage d'un transcriptome de référence. Le travail du docteur Harney portait sur l'analyse de la réponse transcriptomique de larve *H. tuberculata* face à l'acidification. La fusion de ses données à celles obtenues pour ce chapitre portant sur l'immunité a donc permis l'assemblage d'un transcriptome de référence bénéficiant d'une exhaustivité fonctionnelles importante des gènes représenté. Ce transcriptome de référence a été publiée en mars 2016 dans la revue Marine Genomics.

Marine Genomics 28 (2016) 11–16



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Genomics

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



Genomics/technical resources

De novo assembly and annotation of the European abalone *Haliotis tuberculata* transcriptome



Ewan Harney ^{a,*}, Bruno Dubief ^a, Pierre Boudry ^b, Olivier Basuyaux ^c, Markus B. Schilhabel ^d, Sylvain Huchette ^e, Christine Paillard ^a, Flavia L.D. Nunes ^a

^a Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, University of Brest (UBO), Université Européenne de Bretagne (UEB), Place Nicolas Copernic, 29280, Plouzané, France

^b Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Centre Bretagne ZI. Pointe du Diable, 29280 Plouzané, France

^c SMEL (Synergie Mer Et Littoral), Centre Expérimental, 50560 Blainville-sur-Mer, France

^d Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University of Kiel, 24105 Kiel, Germany

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

Article

Pathogen recognition, mucosal immune factors and modulation of apoptosis and NF- κ B play a role in disease resistance in the European abalone

Bruno Dubief¹, Flavia LD Nunes^{1,2}, Olivier Basuyaux³, Christine Paillard¹

¹ Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, University of Brest (UBO), Université Européenne de Bretagne (UEB), Place Nicolas Copernic, 29280, Plouzané, France

² Ifremer Centre de Bretagne, DYNECO, Laboratoire d'Ecologie Benthique Côtière (LEBCO), 29280, Plouzané

³ Synergie Mer et Littoral, Centre expérimental ZAC de Blainville, 50560 Blainville-sur-mer, France

1. Introduction

Rapid changes in global temperatures can have important repercussions for organisms and the interactions with their environment and other species. The host-pathogen interaction between the European abalone *Haliotis tuberculata* and the bacterium *Vibrio harveyi* is a compelling example of how changing environmental conditions can lead to the emergence of disease. *H. tuberculata* is a commercially valuable gastropod found from the north of France to Senegal. In France, exploitation by commercial diving and aquaculture has been severely impacted in Brittany and Normandy by the appearance of a disease caused by *Vibrio harveyi* (Nicolas et al. 2002). Since 1997, wild populations and aquaculture productions have suffered massive summer mortalities reaching as high as 90%, leading to the closure of abalone fisheries in certain locations and essentially all aquaculture activity in Normandy. This emergent disease is closely linked to global warming. Indeed, in experimental conditions, *V. harveyi* is able to kill abalone by septicemia only during the spawning period and when the temperature exceeds 17°C (Travers, Basuyaux, et al. 2009). The distribution of the mortalities along the Brittany and Normandy coasts are congruent with these findings and disease outbreaks in the field have only been reported in areas where the summer maximum temperature exceeds 16.5°C (Huchette & Clavier 2004). Because of the commercial importance of the abalone and the rapid increase of emergent diseases linked to the global warming this last 20 years, this disease was particularly investigated as a host-pathogen model in a global warming context. Previous work has shown that, in addition to temperature, gonadal maturation and spawning induces immune depression which

facilitates the invasion by *V. harveyi* (M.-A. Travers, Le Goïc, et al. 2008). Temperature, in combination with other stressors, such as handling, can also lead to mortality in immature abalone (Cardinaud, Offret, et al. 2014), showing that susceptibility is not specifically induced during gametogenesis but can be provoked by factors that depress the immune system. Indeed, handling or air exposure can affect not only the immune state of abalone, but also negatively impact the expression of genes involved in general metabolism, inducing a depression of metabolic rates and thus increasing susceptibility to the disease. A previous study, aiming to identify genes potentially involved in the resistance of *H. tuberculata* against *V. harveyi*, pointed to metabolic regulation as a principal factor of resistance (Travers et al. 2010). During the successive infection performed in this experiment, gene expression in muscle tissue of moribund abalone and survivors did not show the activation of genes related to immunity, but rather genes involved in the energetic metabolism, such as the glutamine synthetase and the fatty acid binding protein. However, subsequent work that compared a resistant and a susceptible natural population during successive exposures to *V. harveyi* showed that resistant abalone likely have a more efficient immune response against the disease. Resistant abalone exposed to the pathogen a first time exhibited an immune priming effect, such that the phagocytosis index was not significantly affected by the pathogen in a second exposure (Dubief et al. 2017). In addition, the number of individuals where *V. harveyi* was detected in the gills was significantly lower in resistant abalone, suggesting that part of the resistance may be conferred by a greater ability to prevent the settlement of the bacteria on the gills, the primary portal of entry of the pathogen (Cardinaud, Barbou, et al. 2014).. In sum, previous investigations of resistance effectors indicate that both metabolism and immune system can be involved in the resistance. In order to further understand the factors that may explain an improved response of *H. tuberculata* against *V. harveyi*, global gene expression analysis (RNASeq) of the hemolymph was conducted on resistant and susceptible abalone during an exposure with *V. harveyi*. An approach without prior has been shown to be an efficient manner of identifying genes involved in resistance against biotic and abiotic stressors (eg: Nam et al. 2016; Legrand et al. 2016; Pinaud et al. 2016).

In this study we analyzed the global gene expression of the hemolymph during an exposure of three different natural abalone populations during an exposure. The aim of this study was

to examine the mechanisms which can lead to the resistance against *V. harveyi* by comparing the global gene expression patterns from the most resistant population against the most susceptible.

2. Methods

2.1 Abalone and bacterial strains

Experimental infections with *Vibrio harveyi* were conducted on abalone from three geographically distinct populations in France: Saint-Malo (recurrently impacted by the disease), Bretteville (episodic mortality) (Basuyaux & Labrut 2007)) and Molène (no mortality yet reported)(Figure 1). Abalone from Saint-Malo were obtained from commercial fishermen in late May 2013, while abalone from Bretteville and Molène were sampled by scientific research divers from the “Synergie Mer et Littorale” and “Institut Universitaire Européen de la Mer” respectively in July 2013. Abalone from Saint-Malo (shell length 85.4 ± 2.71 mm), Bretteville (shell length 73.32 ± 10.52 mm) and Molène (shell length 70 ± 16.2 mm) were acclimated separately, but under the same controlled conditions for approximately four months and fed *ad libitum* with *Palmaria palmata*. During this period, the temperature was controlled such that the three populations reached maturity at the same time and as close as possible to the first infection (1300 degree-days). Abalone were transferred to infection tanks two weeks before the start of experimentation (September 2013).

The bacteria used for the challenge is a virulent strain of *Vibrio harveyi* (ORM4) isolated from diseased abalone in Normandy, France, during an episode of massive mortalities in 1999 (Nicolas et al. 2002). Bacteria were grown in Luria-Bertani Agar supplemented with salt (LBS) at a final concentration of 20g.l^{-1} during 72 hours at 18°C . Prior to use in the experiment, bacteria were washed with filter sterilized seawater (FSSW) and quantified by optical density measurements at 490 nm.

2.2 Bacterial challenge

Abalone were challenged by three successive infections by immersion separated by periods of three weeks including two weeks of rest. The first two rounds of infection were meant to examine differential survival among the three abalone populations against *V. harveyi*. These two firsts infections ensured that susceptible individuals would be eliminated

from the most resistant population, such that hemolymph sampling during the third infection would be taken from individuals surviving three rounds of exposure to the pathogen (i.e. the most resistance individuals). For the population exhibiting the lowest survival rate, hemolymph was sampled after only one round of exposure to maximize the odds of observing the response of abalone susceptible to the disease. This was done by infecting a control tank at the time of the third exposure for the resistant population, ensuring that abalone from the susceptible population would be responding to a first exposure to the pathogen, while maintaining equivalent infection conditions between resistant and susceptible populations (temperature, amount of time under experimental conditions), for the population exhibiting the lowest survival rate (Figure 1). For each population, 60 abalone were placed in 40 L tanks in a closed system with a summer photoperiod (16h day/8h night), for a number of 10 abalone per tank. Two conditions were performed in triplicate: a control condition with no bacterial exposure and another condition exposed to 10^5CFU.ml^{-1} of *V. harveyi*. After the 24 h exposure, water in all the tanks was renewed at 100%, with subsequent water renewals of 50% taking place each day for the remainder of the infection. For the first infection, the seawater temperature was set to 17°C. In order to increase the virulence of the infection conditions, temperature was increased by 1°C for each subsequent infection (18°C and 19°C for the last infection). Abalone were not fed for one week following exposure to *V. harveyi*, but feeding resumed during the 2-week rest periods in between infections. Dead abalone were counted and removed twice daily during the first and the second exposures as well as during the two-week rest period between exposures. The survival rate of infected and uninfected abalone from Saint-Malo, Bretteville and Molène was computed with a Kaplan-Meier estimate followed by a log-rank test in the R “survival” package (Therneau 2015).

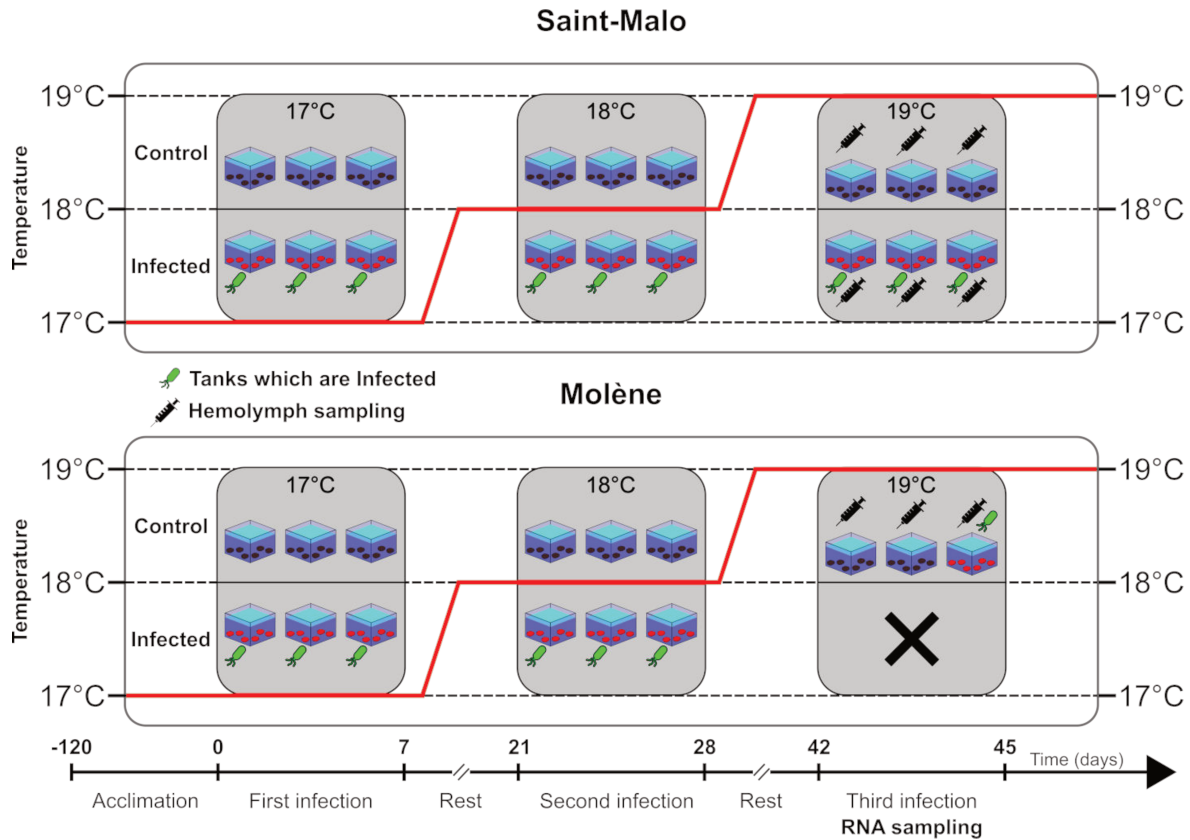


Figure 1: Experimental design for the two populations Molène and Saint-Malo. Green bacteria indicate tanks which are infected and black syringes indicate which tanks were sampled. For the infected condition of Molène, the vast majority of individuals died during the two first infections leaving very few individuals for the third infection. Concerning sampling of infected abalone in Molène, the three replicates were sampled in the same tank.

2.3 Hemolymph sampling, RNA extraction, library preparation and sequencing

Hemolymph used for RNA sequencing was collected 3 days post-infection following the third infection at 19°C. The sampling time at 3 days was chosen in order to sample sick but non-moribund individuals in order to ensure that the observations corresponded to the response to bacterial exposure rather than metabolic distress caused by the imminent death of the animals. Three abalone were sampled from the most susceptible and most resistant population, and for each condition: Saint-Malo Infected (SI), Saint-Malo Uninfected (SU), Molène Infected (MI) and Molène Uninfected (MU). Two milliliters of hemolymph was withdrawn with a 5 mL syringe from each abalone, and spun at 200 rcf for 10 min. The serum was removed, 1 mL of TRIzol reagent (Life Technologies) was added to the pellet, and then the samples were frozen and stored at -80 °C until RNA extraction.

The cellular fraction of the hemolymph was homogenized in TRIzol by bead beating for 1 min, and total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. RNA quality was determined using an Agilent 2100 RNA Bioanalyser (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and concentration with a NanoDrop 8000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

RNA libraries were prepared with the Truseq stranded mRNA kit (Illumina, San Diego, USA), and strand-specific sequencing of 100 bp paired-end fragments was carried out on an Illumina HiSeq 2000 at the GenePool, University of Edinburgh, Scotland. The twelve libraries were sequenced on two lanes of 6 multiplexed samples.

2.4 De novo assembly, quantification and differential expression

Raw reads were cleaned using the Trimmomatic tool (Bolger et al. 2014). Adapters were removed and low quality bases ($Q < 20$) were trimmed with a 4 bp sliding window. The quality of trimmed reads was assessed with FastQC (Babraham Institute). The first ten bases were removed because they showed inconsistencies in the per base sequence content. The pre-processed reads of the 12 libraries combined were assembled using Trinity version 2.0.6 (Haas et al. 2013) using default parameters, and the option “SS_lib_type RF” to specify the sense of sequencing. The assembled transcriptome was filtered by removing sequences shorter than 500 bp. A first alignment of reads against the transcriptome was performed using Bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012). Transcripts for which expression represented less than 2 fragment per kilobase of exon per million reads (FPKM) and isoforms that represented less than 2% of the expression of a gene were removed. A second alignment was made against the filtered transcriptome. Differential expression analysis was calculated at the level of the Trinity isoforms using DESeq2 (Love et al. 2014), using this second alignment. Contigs were considered as statistically differentially expressed (Differentially expressed genes: DEGs) when the Log2FoldChange (LFC) was greater than 2 and the adjusted p-value was below 0.001. A Principal Component Analysis (PCA) was performed with the alignment counts of all the DEGs obtained in order to assess the consistency of replicates and to represent the relationship between them. In addition, overlapping DEGs between each pairwise comparison were identified using a Venn diagram drawn with Venny 2.1.0 (Oliveros 2007).

A heatmap of differentially expressed transcripts was built using median-centered, log2 FPKM values, with the R package “biobase” (Gentleman et al. 2004). Hierarchical clustering grouped transcripts according to similarity of expression among the four experimental conditions, using the R package “cluster” (Maechler et al. 2015).

2.5 Gene annotation

Gene annotation was made following the Trinotate pipeline. Transdecoder was used to detect the Open Reading Frames (ORFs) in Trinity transcripts. ORFs were used as Blastp queries against the Swiss-Prot and UniRef90 databases, with e-value cutoffs at 1e-3 and 1e-5 respectively. A more stringent cut-off was chosen for UniRef90 because of the larger amount of genes present in this database in comparison to Swiss-Prot. The ORFs were also submitted to the Pfam database in order to identify protein domains with the program HMMER (Finn et al. 2011). All non-translated transcripts were used as Blastx queries against Swiss-Prot and UniRef90 databases. Transcripts with significant hits were loaded into a SQLite database containing UniProt-related (Swiss-Prot and UniRef90) annotation information (Bateman et al. 2015). The Gene Ontology (GO) annotations were then retrieved from a report generated from the SQLite database. The visualization of the number of genes per GO terms was carried out using WEGO (Ye et al. 2006). In addition to the manual analysis, the functional analysis of the lists of differentially expressed genes was facilitated by the use of the analytic tool DAVID which allows clustering of genes according to function and to perform enrichment using GO terms as well as a large set of annotation categories (eg protein functional domains, bio-pathways, protein functional domains...) (Huang et al. 2008).

3. Results

3.1 Differential survival rate between the two populations during the two first infections

The two first infections were intended to identify resistant and susceptible populations among the three tested. The Saint-Malo population exhibited little mortality whereas the two others populations, Bretteville and Molène, suffered significant mortalities. Twenty days following the first exposure, the survival rate was 0.926 for Saint-Malo, and 0.538 for Bretteville and 0.425 for Molène respectively (Figure 2). Twenty days following the

second exposure, these rates decreased to 0.852, 0.323 and 0.235 respectively. Abalone from Molène had the lowest survival rate and were considered the most susceptible population, while survival in abalone from Saint-Malo was not significantly different from the uninfected controls ($P=0.174$), thereby demonstrating resistance to *V. harveyi* infection.

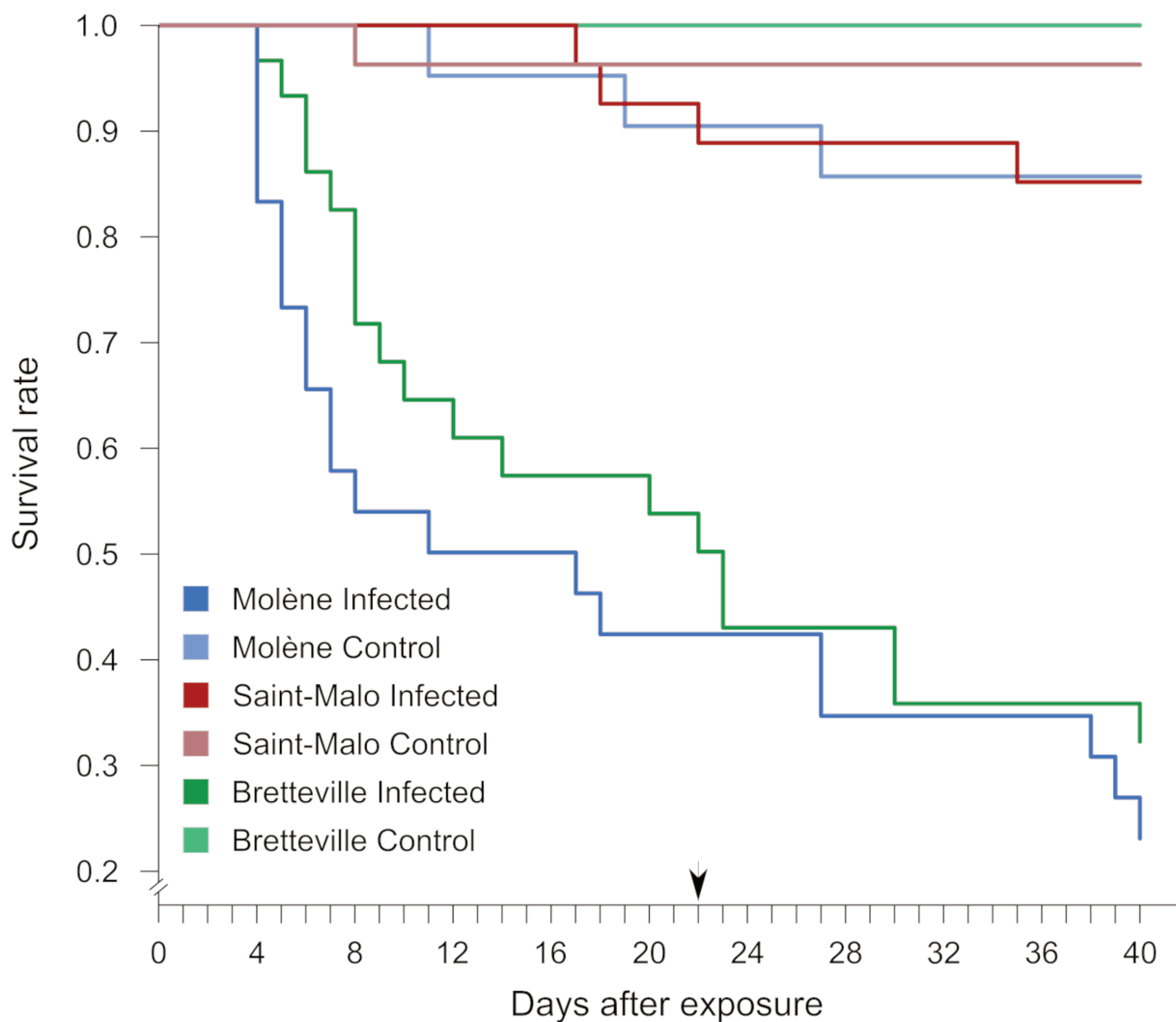


Figure 2: Kaplan-Meier survival rate following the two first exposures of the three populations to 10^5 bacteria/mL during 24 hours at 17°C and 18°C for the first and the second exposure respectively. Black arrow indicates the second infection.

Table 1: Summary statistics of the *H. tuberculata* sequencing, assembly performed with 12 libraries, and annotation.

Reads	Number	Percentage
Number of raw reads	668 045 828	
length	100	
Number of reads after trimming	544 556 316	81.5
average length after trimming	88.9	
Assembly and alignment		
number of contigs	69 643	
number of genes	32 401	
N50	1 752	
average contigs length	1 402	
longest contig	32 767	
Shortest contig	500	
Mapping rate of reads (%)	80.2	
annotation		
Unannotated transcripts	42 210	60.6
Annotated transcripts	27 433	39.4
transcripts with GO terms	21 652	31.4
Best hits *		
<i>lottia gigantea</i>	11 343	41.9
<i>Crassostrea gigas</i>	5 838	21.6
Genre <i>Haliotis</i>	805	3

3.2 Sequencing statistics, assembly quality and functional annotation

A total of 544 556 316 trimmed reads were assembled into 69 643 transcripts, grouped into 32 401 genes (table. 1). Of the 69 643 transcripts, a total of 27 433 contigs were found to have annotations, with 22 064 blast hits against Swiss-Prot, 27 027 against UniRef90 and 19 670 against Pfam databases (Table. 1). Among these, 11 343 (41.9%) contigs presented best hits against *Lottia gigantea* proteins, 5 838 (21.6%) with *Crassostrea gigas* proteins, and the genus *Haliotis* totaled 805 best hits (3%). GO terms were assigned to 21 652 contigs (9 405 genes). Figure 3 shows the distribution of all transcripts among the three main GO term categories: molecular function (14 subcategories), cellular component (14 subcategories) and biological process (23 subcategories). A large number of contigs were classified into these subcategories allowing to distinguish 2992 contigs involved in the response to stimulus and 1 527 contigs involved in the immune system process.

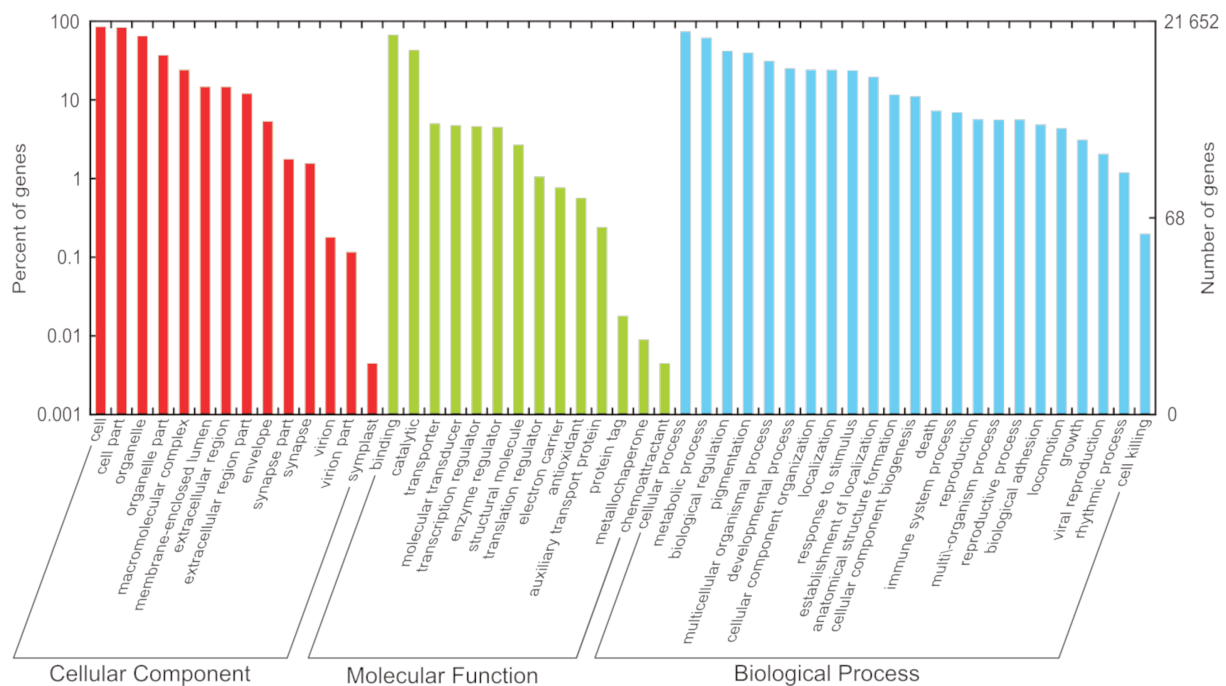


Figure 3: Gene ontology annotation (GO term) of *H. tuberculata*. Distribution of the 14 038 genes which have Go term among the main subcategories of Cellular component (red), Molecular functions (green) and biological Process (blue)

3.3 Differential expression

A total of 2 559 contigs were significantly differentially expressed when using an adjusted p-value of <0.001 and a \log_2 fold change of 2 in DESeq2. Among these, 1 305 (51%) showed significant similarity to known proteins and 979 (38%) had an associated GO term. The PCA built with all DEGs exhibited good consistency between replicates among each condition (Figure 4 A). The first principal component (PC1) explained 45.5% of the variance, and primarily distinguished infected abalone from Saint-Malo (SI) compared to Molène (MI). Differences between infected and uninfected abalone from Molène (MI vs MU) were also captured by PC1 whereas it was not the case for Saint-Malo for which infected (SI) and uninfected samples (SU) were very close on the PC1 axis. The second principal component explained 12.5% of the variance, and distinguished uninfected abalone from Saint-Malo (SU) from the remaining treatments. The number of DEGs obtained in each pairwise comparisons performed among the four experimental conditions (shown in the Venn diagram) are consistent with PCA results (Figure 4 B). The comparison which showed the largest number of DEGs was Saint-Malo infected versus Molène infected (SI vs MI) with 1 797 DEGs. Few

DEGs were observed in the comparison between infected and uninfected abalone from Saint-Malo (SI vs SU = 76), whereas nearly an order of magnitude more DEGs were observed between infected and uninfected abalone from Molène (MI vs MU = 693). The comparison between Molène infected and uninfected shared 419 DEGs with the comparison SI vs MI (Figure 4 B). Hierarchical clustering based on expression pattern differentiated eight clusters (Figure 5). The majority of DEGs were assigned to two clusters: Cluster 1 (C1) included 901 DEGs which were up-regulated only in infected abalone from Molène (MI), while cluster 2 (C2) included 1 143 DEGs which were up-regulated in SI, down-regulated in MI, but showed equivalent expression patterns in the control abalone (SU and MU) (Figure 5). Given the mortalities observed in MI, it is probable that the DEGs observed in the comparison MI vs MU correspond to genes that are involved in the disease development in susceptible abalone. In order to focus on genes associated with disease resistance, DEGs identified by this pairwise comparison were excluded from further analysis. Furthermore, DEGs identified by the pairwise comparison SI vs MI are the most likely to explain differences in disease resistance. Therefore, functional analysis focused on DEGs that were both present in the SI vs MI comparison, and were present in C1 or C2, leading to 433 DEGs (218 annotated) for C1 (Fig. 6 C) and 849 DEGs (408 annotated) for C2 (Fig. 6 D). The genes discussed in this work are listed in Table 2 (C1) and Table 3 (C2). The values of LFC presented in these two tables are extracted from the comparison SI vs MI.

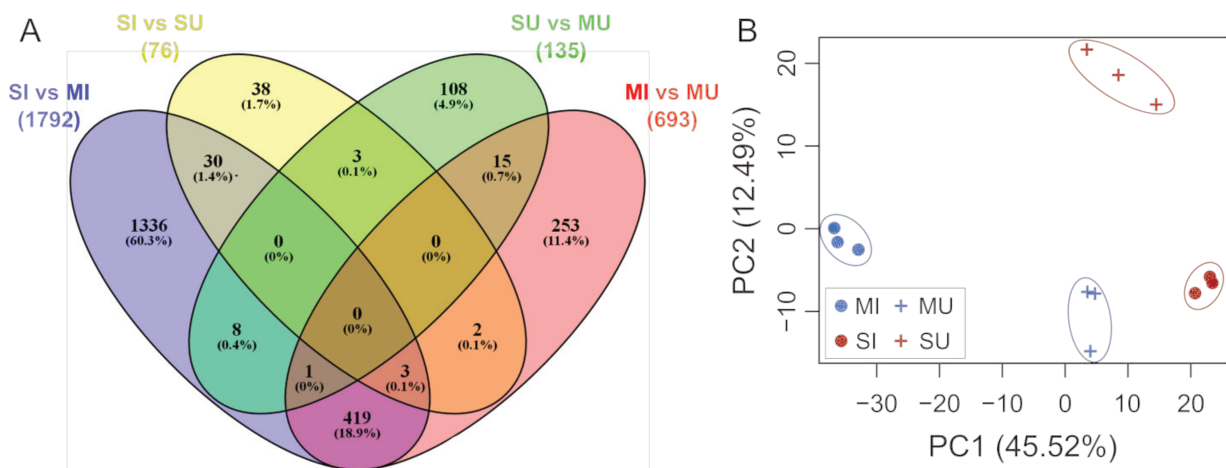


Figure 4: (A) Each circle contains all the differentially expressed transcripts in a pairwise comparison and overlapping parts contain common DEGs among the comparison groups. (B) Principal Component Analysis (PCA) build with all DEGs. SI= Saint-Malo Infected, SU= Saint-Malo Uninfected, MI = Molène Infected and MU = Molène Uninfected.

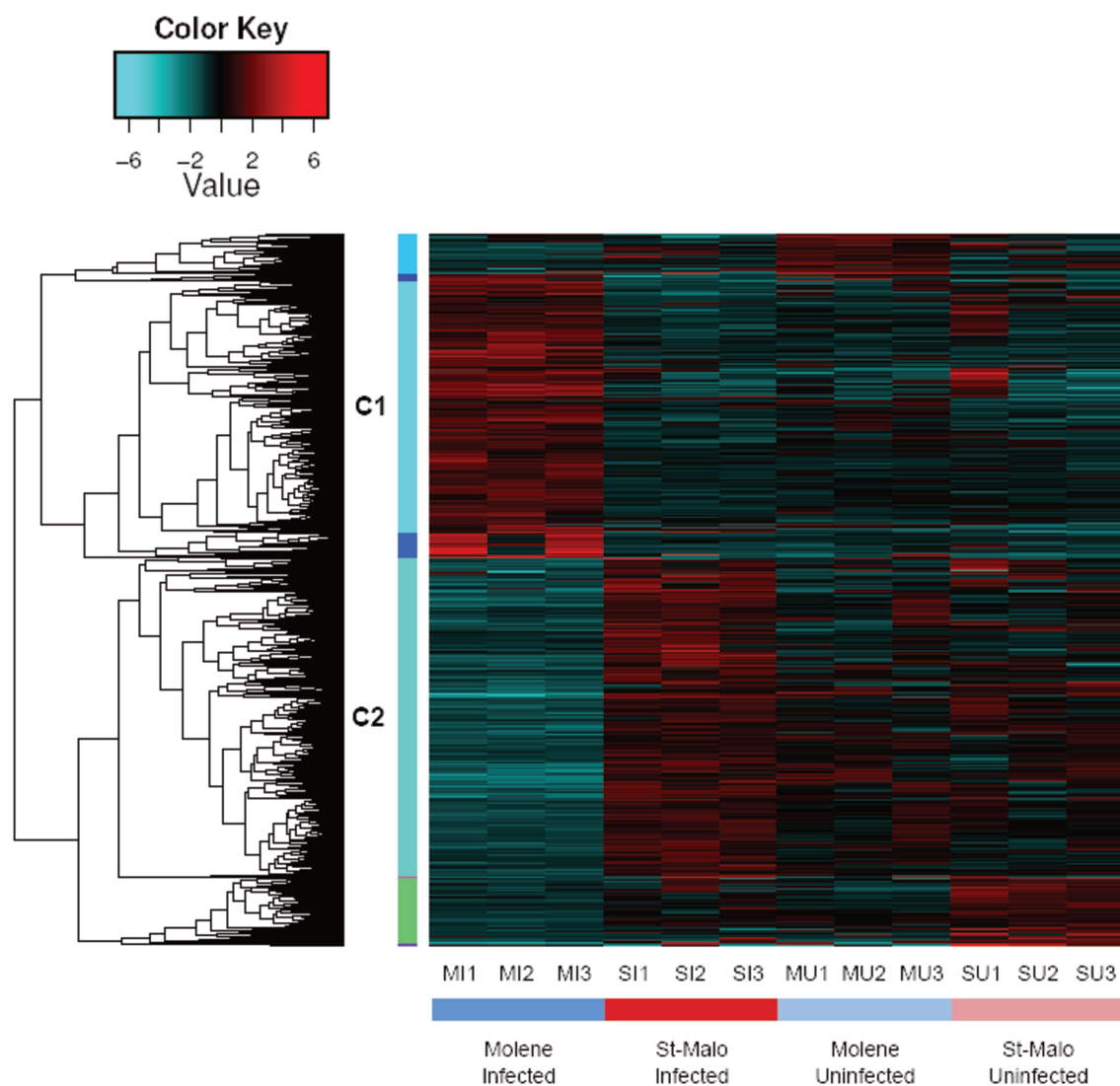


Figure 5: Heatmap built with all the contigs differentially expressed among the four conditions. The blue/black/red color scale indicate the level of expression in $\log_2(\text{FPKM})$ which was median centered for each row. Vertical multicolor bar show the different cluster that were extracted from the hierarchical clusterisation.

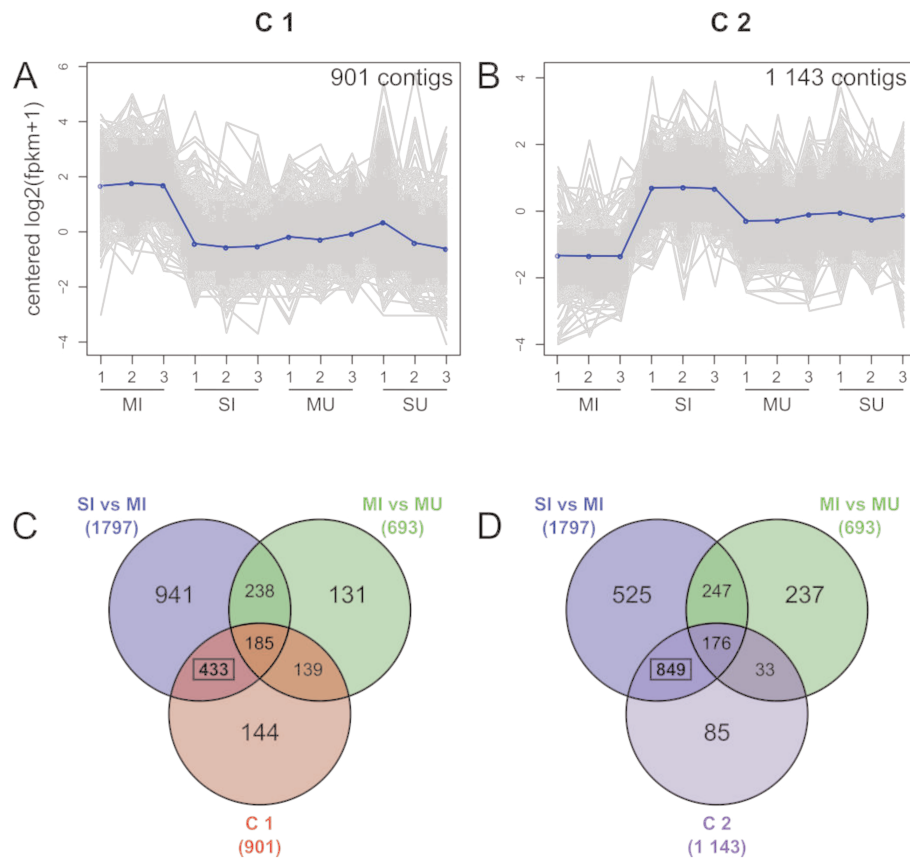


Figure 6: (A,B) plot of the expression level of contigs in each clusters obtained from the heatmap and hierarchical observation. (C,D) Venn diagrams showing the number of contigs that are shared by the clusters and the pairwise comparisons SI vs MI and MI vs MU. The numbers in bold and framed represent the contig lists that are analysed.

Table 2: Immune response genes from the cluster **C1**. P-value and log-FC are extracted from the statistical comparison of SI vs MI. Negative value of Log-FC indicate over-expression in **Molène** infected. "reg GO" indicate genes that are involved in activation or inhibition of TLR pathway (TLR) and apoptosis (death).

Gene family	ID contig	length	log-FC	P-value	gene description	short name	reg GO TLR death
pattern recognition receptors	none						
genes involved in TLR pathway	TR27823_c0_g5_i4	505	-2,72	3,2E-05	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	Kidins220	+
	TR71749_c2_g1_i5	1676	-2,50	4,1E-06	NF-kappa-B inhibitor	IKB	-
	TR33986_c0_g1_i4	1877	-2,15	6,7E-06	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase	PTEN	-
	TR112026_c0_g3_i1	968	-2,15	3,0E-09	Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor	HIF1N	-
	TR104765_c0_g1_i1	1653	-6,44	7,0E-19	Putative glutathione-s-transferase	GST	-
genes involved in apoptosis	TR112048_c0_g1_i1	2087	-3,28	3,0E-05	Metalloenductase STEAP3	STEAP3	+
	TR14857_c1_g1_i1	885	-3,27	4,9E-04	Nuclear apoptosis-inducing factor 1	Naif1	+
	TR91126_c0_g1_i1	1213	-2,79	4,8E-08	Bcl-2-like protein 2	Bcl-2	-
	TR94499_c0_g1_i1	5105	-2,31	2,6E-06	Sestrin-1	SESN1	-
	TR96179_c0_g1_i9	754	-2,31	1,6E-04	DNA damage-regulated autophagy modulator protein 2	Dram2	+
	TR76725_c2_g1_i3	1520	-2,29	5,7E-10	Cystathionine beta-synthase	Cbs	-
	TR79670_c0_g1_i2	3129	-2,24	4,1E-04	Tripartite motif-containing protein 2	Trim2	-
	TR70779_c1_g1_i9	1325	-2,24	1,6E-07	Baculoviral IAP repeat-containing protein 7-B	birc7-b	-
	TR57579_c0_g1_i1	2788	-2,21	4,2E-06	Engulfment and cell motility protein 1	ELMO1	+
	TR33986_c0_g1_i4	1877	-2,15	6,7E-06	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase	PTEN	+
	TR94618_c1_g1_i4	3094	-2,10	1,1E-07	Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1	Trp53inp1	+
	TR96761_c1_g1_i3	1486	-2,08	8,6E-11	Uracil-DNA glycosylase	UNG	-
	TR71291_c1_g2_i1	1529	-2,04	3,9E-11	Protein lifeguard 2 (Bax inhibitor 1)	Bl-1	-
genes involved in ubiquitilation	TR78152_c3_g1_i2	2653	-2,04	9,3E-05	Calpain-B	Calpain	+
	TR3250_c1_g4_i5	1641	-3,79	5,8E-18	SPRY domain-containing SOCS box protein 3	spsb3	
	TR88601_c0_g1_i1	1966	-2,61	9,8E-04	WD repeat and SOCS box-containing protein 1	WSB1	
	TR79670_c0_g1_i2	3129	-2,24	4,1E-04	Tripartite motif-containing protein 2	Trim2	

Table 3: Immune response genes from the cluster **C2**. P-value and log-FC are extracted from the statistical comparison of SI vs MI. Positive value of Log-FC indicate over-expression in **Saint-Malo** infected. "reg GO" indicate genes that are involved in activation or inhibition of TLR pathway (TLR) and apoptosis (death).

Gene family	ID contig	length	log-FC	P-value	gene description	short name	reg GO TLR death
pattern recognition receptors	TR6647_c2_g3_i5	1356	6,57	4,4E-16	Putative C1q domain containing protein	C1qtnf3	
	TR81731_c1_g2_i1	2809	4,63	2,5E-07	Toll-like receptor 4	TLR4	+
	TR14452_c1_g1_i3	3441	4,28	3,0E-09	RIG-I-like receptor	IFIH1	-
	TR74883_c0_g1_i1	2023	3,26	9,5E-05	Peptidoglycan recognition protein 3	PGRP3	
	TR104767_c0_g2_i1	2054	3,04	8,4E-14	Toll-like receptor 13	TLR13	+
	TR42566_c0_g1_i2	2569	2,90	4,6E-04	Toll-like receptor 6	TLR6	+
	TR30271_c0_g1_i1	2464	6,17	3,5E-16	Cis-aconitate decarboxylase	IRG1	-
genes involved in TLR pathway	TR30808_c0_g1_i2	1766	5,45	2,5E-10	Fas ligand-like protein	FASL	+
	TR83994_c2_g1_i8	2884	5,08	3,3E-19	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	MIB2	+
	TR33039_c0_g1_i1	1540	4,50	6,9E-06	Apolipoprotein L3	APOL3	+
	TR14452_c1_g1_i3	3441	4,28	3,0E-09	RIG-I-like receptor	IFIH1	+
	TR1446_c1_g1_i1	1508	4,13	2,8E-08	Neuropeptide FF receptor 2	NPFFR2	+
	TR30791_c0_g2_i3	1417	3,92	1,0E-04	Cathepsin L2	CTSV	+
	TR108090_c0_g1_i2	756	3,78	9,8E-07	Poly [ADP-ribose] polymerase 10	PARP10	-
	TR28648_c1_g4_i8	697	3,73	4,3E-05	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	Zap	+
	TR70752_c0_g2_i4	1350	2,59	1,4E-04	Mitogen-activated protein kinase kinase 13-B	map3k13-b	+
	TR92789_c1_g5_i1	830	2,42	7,4E-07	Caspase-8	Casp8	+/-
	TR61016_c2_g1_i5	2498	2,31	6,6E-04	Alpha-1A adrenergic receptor	Adra1a	+
	TR78061_c1_g1_i3	3355	2,02	5,1E-05	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1	+
	TR96431_c0_g1_i1	1552	5,89	3,23E-12	contains domain TNF(Tumour Necrosis Factor) family	TNFIk	+
	TR30808_c0_g1_i2	1766	5,45	2,5E-10	Fas ligand-like protein	FASL	+
	TR14452_c1_g1_i3	3441	4,28	3,0E-09	RIG-I-like receptor	IFIH1	-
	TR43408_c0_g3_i1	680	4,18	2,2E-12	Caspase-7	Casp7	+
	TR85894_c0_g1_i2	1925	4,00	2,4E-06	N-lysine methyltransferase SMYD2	SMYD2	-
genes involved in apoptosis	TR55556_c0_g1_i1	1584	3,60	7,4E-04	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod	-
	TR92798_c0_g1_i8	1759	3,47	9,34E-04	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	TNFI6	+
	TR2904_c0_g1_i6	2551	3,25	2,9E-05	E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	XIAP	-
	TR93842_c1_g1_i1	1102	2,78	3,7E-04	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10	MEG10	+
	TR92789_c1_g5_i1	830	2,42	7,4E-07	Caspase-8	Casp8	+

Table 3 continued: Immune response genes from the cluster C2.

Gene family	ID contig	length	log-FC	P-value	gene description	short name	reg GO TLR death
genes involved in apoptosis	TR46446_c0_g1_i2	783	2,30	3,9E-06	Glutathione S-transferase 2	GST2	-
	TR94680_c0_g2_i8	2169	2,22	1,4E-06	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	Lrp2	+
	TR97967_c3_g1_i1	3171	2,20	2,2E-05	Neurogenic locus notch homolog protein 3	NOTCH3	-
genes involved in ubiquitination	TR83994_c2_g1_i8	2884	5,08	3,3E-19	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	MIB2	+
	TR96139_c0_g1_i2	2976	3,70	3,3E-10	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	Herc2	
	TR42550_c3_g1_i2	1299	3,34	5,6E-07	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33	Trim33	
	TR2904_c0_g1_i6	2551	3,25	2,9E-05	E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	XIAP	
Other genes	TR32922_c0_g1_i1	2340	5,45	8,6E-15	Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1-B	UDP GalNAc	
	TR44889_c1_g4_i6	2710	2,90	1,3E-11	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1	SVEP1	

4. Discussion

Severe mortality caused by a pathogen can lead to the emergence of host resistance in natural populations. Among marine invertebrates, resistance to disease has been known to occur following severe epizootic events (Friedman et al. 2014; Ford & Bushek 2012). Resistant populations, when compared to susceptible populations, can be particularly informative for identifying the mechanisms that lead to better performance against a pathogen. In this work, we took advantage of the heterogeneous distribution of *H. tuberculata* mortalities caused by *V. harveyi* in Brittany and Normandy, and examined the response to *V. harveyi* infection in three geographically distinct abalone populations: one which was severely and repeatedly impacted by this disease in the past (Saint-Malo), one which suffered episodic and variable mortalities (Bretteville) and one where no mortalities were reported (Molène) (Huchette & Clavier 2004; Basuyaux & Labrut 2007). The Saint-Malo population was expected to be resistant against *V. harveyi* whereas Molène was expected to be susceptible because of its naivety regarding *V. harveyi* disease, and indeed, the survival rates observed during the experimental exposures have confirmed this hypothesis. Twenty days after the second exposure, abalone from Saint-Malo exhibited a survival rate of 85% whereas Bretteville and Molène exhibited 32 and 23% respectively. Similar survival rates have been recorded in a separated successive infection experiment using these two populations (Dubief et al. 2017). Molène, showing the lowest survival rate, was considered as a susceptible population, and was compared to the resistant Saint-Malo population, for transcriptomic analysis. Despite suffering from one important outbreak in 2004 and several episodes of partial mortality, the Bretteville population exhibited a survival rate indicating that abalone from this location still show susceptibility to the disease. Presumably the frequency and severity of epizooties in Bretteville were not sufficient to select for resistance. The emergence of a resistant population is likely dependent upon massive and repeated outbreaks which eliminate susceptible phenotypes and favor the increase in numbers of resistant individuals. In the case of the Eastern oyster *Crassostrea virginica*, a single disease outbreak caused by *Haplosporidium nelsoni*, despite being severe was insufficient to lead to resistance of the Delaware Bay populations (Ford & Bushek 2012). After this epizooty, susceptible individuals living in a protected area from the disease still contributed offspring within the bay, conserving susceptible phenotypes in the population. It was only after more

extreme and widespread mortalities that populations from this bay became resistant to the pathogen.

Thus, transcriptomic analyses were performed in order to compare the global differential response in gene expression of susceptible and resistant abalones, with the aims to highlight which mechanisms can be involved in the development of the disease in the Molène population but almost importantly, which mechanisms can explain the resistance of Saint-Malo. The *H. tuberculata de novo* transcriptome produced here consisted of 69 643 contigs including 27 433 which were annotated (39.4%), with an N50 of 1752 and an average contig length of 1402 bp. The quality and the annotation level of the transcriptome are comparable to other *de novo* transcriptomes from non-model molluscs (L. Zhang et al. 2014; Teaniniuraitemoana et al. 2014; Nam et al. 2016; Harney et al. 2016). The differential expression analysis indicates that the greatest difference in number of DEGs was obtained in the pairwise comparison between infected abalone from Saint-Malo and Molène (SI vs MI =1792) showing a very different response of these two populations to the disease. This differential response can be explained by two factors. First, the survival rates observed during the two first infections exhibited a natural resistance of this population against *V. harveyi*. In addition, immune priming has been demonstrated in *H. tuberculata* following a first exposure to *V. harveyi* (Dubief et al. 2017), such that the inhibition of phagocytosis of 40% observed after a first exposure, was no longer observed after a second exposure performed 28 days later, suggesting improved performance against the pathogen in subsequent infections. Immune priming may therefore exacerbate the differences between Saint-Malo and Molène, a population which is not only naturally susceptible, but was also sampled after a first infection and thus would not exhibit an immune priming response. Hierarchical clustering performed with all DEGs identified two major clusters (Figures 5 and 6 A, B), from which DEGs presumed to be involved in the disease development and not related to specific resistance or susceptibility were removed (Figure 6 C,D). Thus, the following discussion focuses on the interpretation of these two filtered clusters: C1 (433 DEGs) and C2 (849 DEGs), with particular attention given to the latter, because the level of expression of the transcripts in the cluster C2 was higher in infected individuals from the resistant population (SI) compared to infected individuals from the susceptible population (MI) whereas the level of expression in control abalone in both populations (SU and MU) were

similar (Fig.6 A). Briefly, the cluster C1 (DEGs over-expressed only in infected abalone from Molène) was associated to the susceptible response, and C2 (DEGs over-expressed in Saint-Malo and down-regulated in Molène) was associated in the resistant response.

Patterns of gene expression show stimulation of the immune system in the resistant population. In cluster C2, 14.7% of DEGs (43 out of 293 genes with GO term) were annotated as “immune system process”, compared to only 4.6% (8 out of 174) in cluster C1. These numbers suggest greater involvement of the immune system in the response of Saint-Malo compared to Molène. However, these values are just indicatives because numerous genes that are involved indirectly in immunity are not necessarily annotated as such by gene ontology classification. Like all mollusks, *H. tuberculata* lacks an adaptive immune system, and its response to pathogens relies only on the innate immune system which is composed of humoral and cellular responses. Innate immunity requires numerous processes to effectively fight pathogens, such as chemotaxis, recognition, activation of particular immune pathways and the secretion of molecules that help to maintain homeostasis during the immune response but also effectors that can stop the pathogen in the portal of entry (Allam & Raftos 2015; Allam & Pales Espinosa 2016). Genes identified in cluster C2 include numerous genes involved in several of these essential steps in the innate immune response.

4.1 Pattern recognition receptors

The first step of the innate immune response is the recognition of an infectious agent. Invertebrates are able to recognize in a fairly specific manner a wide variety of pathogens through a large diversity of pattern recognition receptors (PRRs) including Toll-like receptors (TLR), peptidoglycan (PGN) recognition, and lectins (Royet 2004). Many genes involved in non-self-recognition were found in the cluster C2. Among the most over-expressed genes in C2 was a gene containing the C1q domain. The C1q domain is a very versatile PRR which can recognize a large panel of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Liu et al. 2014). This domain is the first step in the classical complement pathway which is an evolutionarily ancient defense mechanism involved in numerous process of the immune response (Fujita et al. 2004). A recent study performed on gene-expression of *Haliotis discus discus* identified three C1q domain-containing proteins and showed that these genes were up-regulated following injection with lipopolysaccharides (LPS), gram negative

and gram positive bacteria (Bathige et al. 2016). Given that C1q is the most differentially expressed PRR, this receptor probably plays an important role in the recognition of *V. harveyi*.

The three TLRs 4, 6 and 13 were shown to be up-regulated in abalone from Saint-Malo. TLRs are PRRs which, in numerous invertebrates, are involved in the recognition of PAMPs (Wang et al. 2016; Toubiana et al. 2013). LPS found in the outer wall of bacteria has been found to be a ligand of TLR4 across a broad range of organisms (Barton et al. 2003). Even if there are considerable differences in gene expression patterns stimulated by individual TLR family members, TLRs have the common characteristic of activating several signaling pathways, such as MAPK, JNK, p38 or nuclear factor- κ B (NF- κ B), which in turn are strongly involved in the immune response (Baeuerle & Henkel 1994; Rauta et al. 2014). Surprisingly, the cluster C2 also exhibited the over-expression of the RIG-I-like receptor (retinoic acid-inducible gene I) which activation is known to trigger type 1 interferon (IFN-1). Originally thought to only be involved in the recognition of RNA/DNA viruses, the RIG-I-like receptor is now known to also be activated by various PAMPs including those of bacterial origin, such as LPS or PGN (Chen et al. 2012). Finally, Peptidoglycan recognition protein 3 (PGRP) was over-expressed in resistant abalone. PGRPs are proteins that bind to PGN which is an essential component of both gram negative and gram positive bacteria (Steiner 2004). Among PGRPs, some bind preferentially to lysin-type PGN found in most Gram positive bacteria, and others bind to mesodiaminopimelic acid (DAP) found in most Gram negative bacteria showing an important role of PGRPs in the recognition of either gram negative and gram positive bacteria (Zaidman-Rémy et al. 2006). Whereas many genes involved in pathogen recognition are found over-expressed in resistant abalone from Saint-Malo (cluster C2), no genes with this function were found to be modulated in expression in infected abalone from Molène (cluster C1), suggesting a failing of this critical immune process in the response of Molène. Avoiding host recognition allows pathogens to survive and proliferate. Pathogen-induced downregulation of PRRs is one possible mechanisms for disabling host defense, as has been demonstrated by the downregulation of human TLR 2 and 4 induced by *Ehrlichia chaffeensis* infection (Lin & Rikihisa 2004). For *H. tuberculata*, previous work demonstrated the ability of *V. harveyi* to inhibit phagocytosis by observing a reduction in p38 MAPK phosphorylation (Travers, Bouffant, et al. 2009) which is typically activated

following TLR recognition (Rauta et al. 2014). **For *H. tuberculata*, effective pathogen recognition may be one of the factors leading to the improved response of Saint-Malo against *V. harveyi* whereas the lack of this TLR activation in Molène could lead to the inhibition of down-stream pathways linked to immune response, like p38 MAPK.**

4.2 TLR signaling pathway

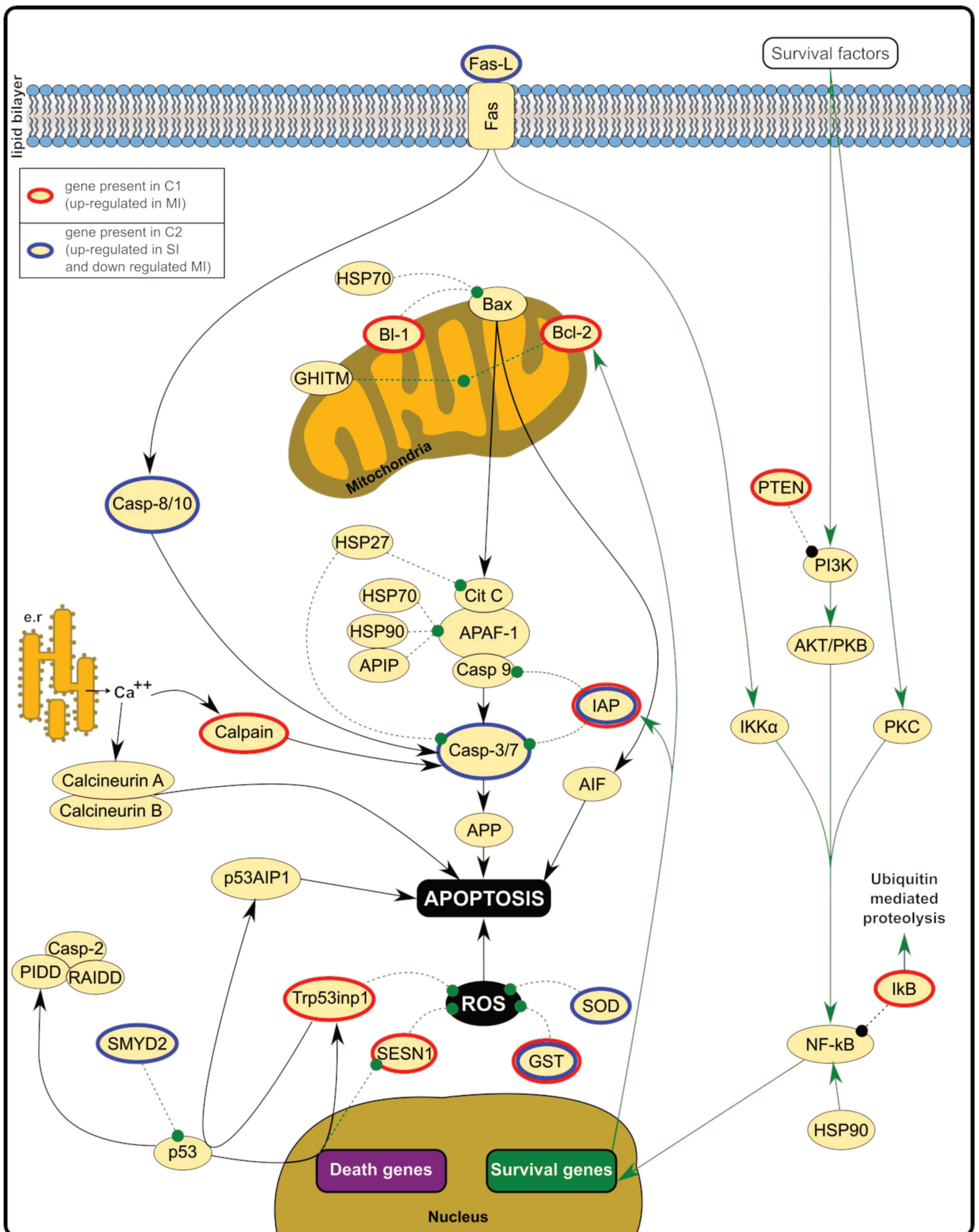
The TLR pathway not only plays a crucial role in innate immunity via pathogen recognition, but also by activating several pathways leading to an adapted response to the infection (Takeda & Akira 2005). The TLR pathway is particularly developed in invertebrates that rely solely on innate immunity to respond to an infection (Rauta et al. 2014). It comprises several pathways such as the NF- κ B, the MAP kinase signal transduction, and interferon regulatory factors (IRF). In the cluster C2, several genes upregulated are involved in the activation of this pathway. The LPS recognition receptor TLR4 which is strongly up-regulated in Saint-Malo can activate either IRF3/7 or the NF- κ B which are involved in the induction of transcription of specific immune related genes (Baeuerle & Henkel 1994; X. Zhang et al. 2014). The two others TLR receptors found to be up-regulated in resistant abalone (TLR 6 and 13) are also implicated in the activation of NF- κ B, which in turn activates genes involved in numerous immune responses such as pro-inflammatory cytokine synthesis, hemocyte proliferation or production of antimicrobial peptides. Hemocytes from infected abalone from Saint-Malo show several up-regulated genes that, in vertebrates, are involved in the positive regulation of the I κ B kinase (IKK) (table. 1: Zap; APOL3; MIB2; IFIH1) suggesting an activity of NF- κ B pathway. Indeed IKK plays a pivotal role in the regulation of this pathway by phosphorylating the inhibitor of NF- κ B (I κ B) allowing NF- κ B transcriptional activity (Malek et al. 2001). Patterns of gene expression observed in the cluster C2 suggest an activation of NF- κ B in Saint-Malo, however, no genes involved in the activation of this pathway were differentially expressed in infected abalone from Molène (C1). This lack of NF- κ B activators is coherent with the finding that no up-regulation of PRR-related genes supposed to activate this pathway was detected in the Molène population. Moreover, the over-expression of a gene known to inhibit NF- κ B activation has been observed in Molène population: the Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor (HIF1N). This gene is involved in the inhibition of Hypoxia-inducible factor 1-alpha that has been shown to activate IKK and thus NF- κ B (Rius et al. 2008). Surprisingly, Molène exhibits the up-regulation of the inhibitor

of NF- κ B (I κ B). The expression of I κ B can be a feedback response of the activation of NF- κ B, preventing a too strong response which could be deleterious. Indeed, this transcription factor auto-regulates its activity by inducing its own inhibitor which is continually eliminated in the proteasome to continue the transcription activity of NF- κ B until the end of the response. Thus many studies in the literature consider that the expression of I κ B is a proxy of NF- κ B activity (De Zoysa et al. 2010; X. Zhang et al. 2014; Green & Barnes 2009). It is very surprising to observe a potential activation of NF- κ B in Molène because in the cluster 1 no PRRs nor IKK activation effectors were observed as up-regulated in this population. In fact, a previous study that showed a down-regulation of Rel/NF- κ B linked with a reduction of both reactive oxygen species (ROS) production and phagocytosis in abalones after 24 hours of exposure to *V. harveyi* would rather suggest that the inhibition of NF- κ B is linked with a susceptible response (Cardinaud et al. 2015). Several host/pathogen studies have shown the capacity of microbial pathogens to interfere with various aspect of innate immune signaling including NF- κ B (Narayanan & Edelmann 2014). However, in the light of the actual knowledge of this pathway in the abalone, and the unknown virulence factors with which it interacts, it is currently not possible to state whether NF- κ B is activated or not.

Inflammatory response that is too acute can be deleterious for an organism. For example, the exaggerated activation of TLR4-mediated NF- κ B provokes sepsis and its regulation is needed to avoid damaging effects (Wittebole et al. 2010). The regulation of the inflammatory effects of NF- κ B during infection is thus essential to produce an adequate response. Therefore, an appropriate NF- κ B immune response goes hand in hand with the expression of inhibitor and anti-inflammatory genes that regulate this response. Some of these effectors were observed in Saint-Malo, such as the up-regulation of Immune Responsive Gene 1 (Table1. PARP1; IRG1) which can inhibit the TLR-triggered inflammatory response (Li et al. 2013). Abalone from Saint-Malo also exhibits the up-regulation of Superoxide dismutase (SOD) and Glutathion-S-transferase (GST) which are involved in the maintenance of oxidative homeostasis of cells and are essential to counteract deleterious effects of inflammatory response. In cluster C1, a Putative glutathione-s-transferase is also present with a high LFC value (-6.44). Indeed, inflammation as well as phagocytosis are responsible for the production of ROS such as hydrogen peroxide which have to be managed by hemocytes. The enzymes SOD and GST are closely linked to ROS regulation and are often

expressed in bacterial infections (Manduzio et al. 2005; Richard et al. 2015; Saranya Revathy et al. 2012). **Taken together, these results seem to exhibit an appropriate response of Saint-Malo to the infection, with expression of genes that suggest an activation of inflammatory response balanced with inhibitors and homeostasis-related genes.**

Figure 8: Apoptosis pathway. Red boxes indicate genes from the cluster C1 and blue from the cluster C2. Dotted lines finishing in a circle indicate inhibition and solid arrow indicate activation. Green connectors highlight the survival pathway and black the apoptosis pathway. *FasL*: Fas ligand protein ; *Fas*: death receptor Fas; *HSP*: Heat shock protein; *Bax*: Apoptosis regulator BAX ; *BI-1*: Bax inhibitor 1 ; *GHITM*: Growth hormone-inducible transmembrane protein = Transmembrane BAX inhibitor motif-containing protein 5; *Bcl-2*: Apoptosis regulator Bcl-2; *Casp*: Caspase; *PTEN*: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN ; *PI3K*: Phosphatidylinositol 3- kinase ; *AKT/PKN*: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase = Protein kinase B; *IkB*: Inhibitor of NF-κB; *IKKα*: IκB kinase alpha; *PKC*: Protein kinase C ; *NF-κB*: Nuclear factor kappa B; *Cit C*: Cytochrome C ; *APAF-1*: Apoptotic protease-activating factor 1; *IAP*: Inhibitor of apoptosis ; *AIF*: Apoptosis-inducing factor 1 mitochondrial; *APP*: Amyloid beta A4 protein; *PIDD*: p53-induced protein with a death domain; *RAIDD*: Caspase and RIP adapter with death domain; *p53*: Tumor suppressor p53; *SMYD2*: N-lysine methyltransferase SMYD2; *P53AIP1*: p53-regulated apoptosis-inducing protein 1; *Trp53inp1*: Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1; *SESN1*: Sestrin 1 *GST*: Glutathion-S-transferase; *SOD*: Superoxide dismutase; *ROS*: Reactive Oxygen Species; e.r : endoplasmic reticulum. Modified from (Moreira et al. 2012)



4.3 Apoptosis

Apoptosis is a process that plays a critical role during an immune response (Terahara & Takahashi 2008). Indeed, apoptosis allows the clearance of damaged or infected cells during an infection without provoking inflammation. In some host/pathogen interactions, the ability of a host to rapidly trigger apoptosis can be linked to resistance against a pathogen by removing phagocytosed bacteria and stopping their spread through the circulatory system of the host (Goedken et al. 2005; Chávez-mMrdonez & Gallardo-Escárate 2014; Romero et al. 2015). Apoptosis can be induced by intrinsic pathways, in response to internal damage (DNA damage, excessive concentration of ROS due to inflammation and/or oxidative bursts following phagocytosis), or by extrinsic pathways, in response to external signals through death receptors. The regulation of apoptosis depends on numerous genes, and many of which were modulated in expression in infected abalone from both Saint-Malo and Molène (clusters C1 and C2, Figure 6).

Regarding expression patterns observed in the resistant abalone from Saint-Malo (cluster C2), the up-regulation of the Fas Ligand protein, which belongs to the Tumor Necrosis Factor (TNF) family, Caspase 7 and 8 suggest an activation of the extrinsic pathway of apoptosis through the death receptor Fas. There are also several transcripts which exhibit protein domains that belong to the TNF family in the cluster C2 and these numerous transcripts show among the highest LFC value of the cluster. TNFs are responsible for the extrinsic activation of apoptosis and their high value of LFC seems to show an important stimulation of apoptosis in Saint-Malo. However, the apoptosis process is complex and some of its effectors can have both anti- and pro-apoptotic activity, such as FasL, which can be involved in both caspase activation (pro-apoptotic), which seems to have occurred in Saint-Malo, but also in NF- κ B activation (anti-apoptotic)(Kreuz et al. 2004). FasL has been characterized in *Halotis discus discus* and linked with the induction of ROS production, suggesting a role in inflammatory response (Lee et al. 2012; De Zoysa et al. 2009). In addition, the activation of NF- κ B described above, which seems to have occurred in Saint-Malo, is also known to have pro-survival effects (Sokolova 2009). An interesting gene is up-regulated in Saint-Malo and involved in anti-apoptotic activity: the N-lysine methyltransferase SMYD2. In human, this protein is responsible of the methylation of Lys-370 of the transcription factor p53 which reduces its DNA-binding efficiency leading to a

decrease of pro-apoptotic gene transcription (Huang et al. 2006). Finally, GST and SOD up-regulation in Saint-Malo also confer a pro-survival effect by their anti-oxidant activity.

In susceptible abalone from Molène, (cluster C1), both pro and anti-apoptotic genes are also observed. As in the cluster C2, the cluster C1 exhibits an IAP as well as several other genes that are involved in the inhibition of apoptosis including two important anti-apoptotic regulators: the Protein lifeguard 2 which is an inhibitor of the pro-apoptotic protein bax and the Bcl-2-like protein 2. The most striking anti-apoptotic gene up-regulated in abalone from Molène is GST because it exhibits the greatest LFC value of the cluster (-6.44) which could be due to a normal oxidative stress response of abalone from Molène or by an induction of anti-apoptotic response by the bacteria. High concentration of ROS is one of the factors that can trigger apoptosis, but GST plays a significant anti-apoptotic role in such a context (Simon et al. 2000). In addition to the potential oxidative stress suggested by the high level of expression of GST, two genes induced by the tumor suppressor p53 are up-regulated in Molène: the sestrin-1 and the Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1 (Trp53inp1). In response to oxidative stress, p53 induces first the antioxidant protein sestrin. Trp53inp1 is also an antioxidant, however it is mainly involved in the positive feedback signal of p53 to continue its pro-apoptotic regulation through the transcription of the gene p53AIP1 which is directly involved in apoptosis (Cano et al. 2009; Okamura et al. 2001). The cluster C1 presents also the Uracil-DNA glycosylase, which is further proof of the stressful state of hemocytes in abalone from Molène. Indeed, this enzyme is expressed in response to oxidative DNA damage and misincorporation of dUMP during replication. It serves to both excise uracil nucleotides and remove 5-fluorouracil and oxidation products of cytosine (Akbari et al. 2007).

In apoptosis, the initiation of programmed cell death results in the domination of apoptotic signals over anti-apoptotic. In this experiment, the results suggest a great competition between these two signals with many genes up-regulated involved in both of these responses and in both populations. The apoptosis pathway is very complex. Based solely on the basis of gene expression, it is currently not possible to conclude whether survival or cell death signals dominate. However, in the light of the previous work performed on the response of *H. tuberculata* to *V. harveyi* infection, it appears that in a susceptible response to the disease, hemocytes do not enter massively into apoptosis. Indeed,

hemocyte viability and total hemocyte count (THC) performed in several previous experiments did not show any significant hemocyte mortality or a decrease in THC during infection by *V. harveyi*, and these findings were found in both the Saint-Malo and Molène populations, as well as in susceptible abalone originating from aquaculture (Travers, Bouffant, et al. 2009; Dubief et al. 2017). However while a potential activation of the immune response through the activation of PRRs and other IKK activators appears to have occurred in Saint-Malo, this does not seem to be the case in Molène. Thus a potential failure to activate apoptosis combined with a lack of antimicrobial response through the TLR pathway can be very deleterious and is reminiscent of a pathogen invasion strategy often demonstrated where the pathogen inhibits apoptosis and activates anti-apoptotic factors of NF- κ B to avoid lysis inside hemocytes (eg. Goebel et al. 2001; Bruchhaus et al. 2007). In fact, T3SS effectors of bacterial pathogens have been shown to subvert signaling, particularly cell survival, and innate immunity, particularly phagocytosis, NF- κ B, and MAPK pathways (Raymond et al. 2013). Therefore, the ability to effectively activate apoptosis can be valuable in the resistance against a disease. In Saint-Malo, many genes of the TNF family are strongly up-regulated, counteracted only by an IAP which is also up-regulated in Molène. This last population did not show any TNF effectors which suggest that the apoptosis stimulation is weaker in Molène than in Saint-Malo. In addition, the apoptosis-related gene expression patterns in Molène seem to show a stressful state of hemocytes from Molène which can be deleterious for its immune activity. However, further work regarding virulence factors of *V.harveyi* are needed to examine the potential manipulation of the apoptosis and TLR pathways in abalone by *V.harveyi*, which would lead to a better understanding of the complex molecular immune response in the two populations against *V.harveyi*

4.4 Mucosal immune factors

The success of pathogen infections relies in part in their ability to adhere and penetrate into their hosts. Thus, the host portal of entry, namely the mucosal tissue, is likely to be involved in the resistance to pathogens (Allam & Pales Espinosa 2016). Concerning *H. tuberculata*, previous studies showed that the gills and hypobranchial gland were the most likely portal of entry of *V. harveyi* into *H. tuberculata* (Cardinaud, Barbou, et al. 2014). In

addition, detection of *V. harveyi* on the gills of abalone was significantly lower in the resistant population Saint-Malo than in Molène, suggesting an involvement of gill effectors in the resistance of Saint-Malo (Dubief et al. 2017). Interestingly, the cluster C2 exhibited a substantial up-regulation of the gene: Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1-B (C1GALT1). This gene, which has been characterized in *Biomphalaria glabrata* is an enzyme which catalysis the first step of mucin-type O-glycosilation leading to mucin biosynthesis. Mucin is the major component of mucus and is responsible for its viscous properties (Taus et al. 2013). Many studies have shown the involvement of mucins in the resistance of hosts against pathogen through different effects: as anti-adherent effects, antibacterial effects or simply by trapping bacteria, thus preventing access to mucosal tissue and penetration (Linden et al. 2008; Kim & Ho 2010). Given the transepithelial migration ability of mollusk hemocytes (Allam & Pales Espinosa 2016), up-regulation of UDP-GalNAc could explain in part the better ability of Saint-Malo to prevent settlement of *V. harveyi* on their gills, especially as this transcript exhibited one of the highest LFC value of the cluster C2.

5. Conclusion

This work focuses on the immune response, with an analysis of PRRs, NF- κ B and apoptosis pathway because of the significant amount of genes present in the two clusters extracted from the total DEGs. Even if NF- κ B pathway and apoptosis are known to be evolutionary conserved (Sokolova 2009; X. Zhang et al. 2014), further gene characterization is needed to improve and clarify the interpretation of these very complex pathways. Nonetheless, this study allows observing a strong involvement of immune system in the differential susceptibility of these two populations and pointed to a lack in bacterial recognition in Molène linked with a subsequent lack of immune pathway activation. Apoptosis seems to be an important pathway in the response against the disease with very different responses being observed between Molène and Saint-Malo. Future would have to focus on the different ability of Molène and Saint-Malo to activate apoptosis during an infection. The analysis of Saint-Malo response highlights also the significant involvement of portal of entry effector consistently with previous work. This global approach allowed an

overview of the main immune responses and has identified new genes and pathways that could be further examined in future research. Analyses of differential expression over the course of infection process in these two populations would be needed to assess in a more specific way the involvement of the genes highlighted in the present study.

CHAPITRE 3

LA METHYLATION DE L'ADN

CHEZ *HALIOTIS TUBERCULATA*

Introduction de l'article

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique qui est impliqué dans la régulation des gènes, sans pour autant modifier la séquence de l'ADN. Chez l'homme, l'accumulation d'altérations épigénétiques due au vieillissement a été mis en lien avec de nombreuses maladies (Fraga & Esteller 2007). Par ailleurs, ces mécanismes se révèlent être cruciaux dans la différenciation cellulaire et donc dans le développement embryonnaire (Reik 2007). Concernant les mollusques, mais aussi l'ensemble des invertébrés, cette discipline reste à ce jour très peu avancée. Cependant, les quelques études déjà réalisées sur des mollusques semblent indiquer un rôle fonctionnel non négligeable chez cette embranchement. Plusieurs études ont d'ailleurs suggéré l'implication de mécanismes épigénétiques dans des phénomènes de priming immunitaire (Green, Vergnes, et al. 2016; Norouzitallab et al. 2016). Cependant, aucune étude n'a été effectuée concernant l'existence et l'implication d'un tel mécanisme chez *Haliotis tuberculata* ni même dans l'ensemble du genre *Haliotis*.

Les deux premiers chapitres de ce travail visaient à caractériser et comparer les réponses respectives d'une population sensible (Molène) et d'une résistante (Saint-Malo), face à l'infection. Ils ont permis de souligner certains facteurs impliqués plus particulièrement dans la résistance ou la sensibilité à la maladie.

L'étude qui suit s'inscrit dans une autre échelle de temps car elle ne vise plus à différencier la réponse immédiate de ces deux populations d'ormeaux face à la vibriose mais plutôt à caractériser une empreinte sur le génome de l'ormeau qui aurait été induite par la méthylation de l'ADN, elle-même modulée par les facteurs biotiques (mortalité subies par Saint-Malo) et abiotiques (températures différentes) des deux populations. Pour résumer, cette étude vise à caractériser une potentielle divergence d'évolution non pas génétique, mais épigénétique.

N'ayant aucune information sur le système de méthylation de l'ormeau, ni même sur son existence au sein du genre *Haliotis*, l'un des objectifs de cette partie sera donc d'avancer des preuves de son existence chez cet animal par une approche *in silico*.

Article

L'espèce *Haliotis tuberculata* possède-t-elle un système de méthylation de l'ADN, et celui-ci peut-il être lié aux différences phénotypiques observées entre les populations naturelles ?

1. Introduction

La génétique, qui consiste en l'étude de la structure primaire de l'ADN, à savoir sa séquence de nucléotides, est une discipline qui a été largement utilisée dans le cadre d'études des relations hôte-pathogène. Cependant, l'ensemble de la variabilité phénotypique observée dans le milieu naturel, et donc des réponses apportées par un organisme face à un stress biotique ou abiotique, ne peuvent être expliquées seulement par des différences de séquence d'ADN. En effet, la régulation de l'expression du génome, dont résulte cette variabilité phénotypique est le fruit de différents mécanismes dont plusieurs sont épigénétiques. L'épigénétique, comme son préfixe l'indique, s'intéresse à tous les mécanismes intervenant « au-dessus » du génome, et modulant la régulation de l'expression des gènes sans en altérer la séquence génétique mais pouvant tout de même être transmis lors d'une division cellulaire. Si les mécanismes épigénétiques partagent avec la génétique la caractéristique d'être héréditaires, ils ont cependant la particularité d'être réversibles et donc plus sensibles à l'environnement. Ceux-ci peuvent donc potentiellement occuper une place importante dans la plasticité phénotypique induite par l'environnement chez les invertébrés. Ces mécanismes peuvent être de différentes natures comme la modification de protéines histones ou la méthylation de l'ADN, tous les deux rendant les gènes plus ou moins accessibles à la transcription, ou encore par l'activité d'ARN non codant (Deakin et al. 2014). Le plus étudié de ces mécanismes est la méthylation de l'ADN. Ce mécanisme consiste en l'addition par liaison covalente d'un groupement méthyl à l'extrémité 5' d'une cytosine suivie directement par une guanine (CpG). Chez les mammifères, le taux de 5-méthylcytosine présent dans les dinucléotides CpG est très important (70 à 80%) et son rôle dans l'expression des gènes a été très étudié. Chez ces derniers, la méthylation des CpG est principalement associée à la répression de l'expression de gènes par la méthylation de CpG

localisés dans les régions promotrices de gènes. Cette méthylation est réalisée par les enzymes ADN méthyltransférases (DNMTs). L'ADN méthylé est ensuite reconnu par des « methyl-binding proteins » (MBDs) qui se lient spécifiquement aux cytosines méthylées et qui a pour effet de rendre le promoteur du gène inaccessible à un possible facteur de transcription (Sengenès 2012).

Cependant, la méthylation de l'ADN chez les invertébrés présente des caractéristiques bien différentes de celles des mammifères. Contrairement à ces derniers qui présentent des méthylations des CpG aussi bien dans des zones intragéniques que intergéniques, la méthylation des CpG chez les invertébrés est observée en grande majorité dans des zones intragéniques (Fneich et al. 2013; Gavery & Roberts 2013). Le rôle des méthylations intragéniques n'a pas encore été parfaitement caractérisé mais plusieurs études ont démontré sa possible implication dans la régulation de la transcription observée chez l'huître *Crassostrea gigas* (Gavery & Roberts 2013; Olson & Roberts 2014) et de l'épissage alternatif, observé chez *Apis mellifera* (Shukla et al. 2011; Li-byarlay et al. 2013; Gavery & Roberts 2014). Plusieurs travaux récents ont étudié l'impact de l'environnement sur les mécanismes de méthylation de l'ADN chez les invertébrés ainsi que les plantes qui présentent le même type de méthylation (Kucharski et al. 2013; Dimond & Roberts 2015; Yu et al. 2013).

Ainsi, l'ensemble des propriétés de la méthylation de l'ADN en font un processus d'un grand intérêt dans l'étude des interactions hôte-pathogène et de leur coévolution (Gómez-Díaz et al. 2012). Les mortalités de l'ormeau européen causées par *V. harveyi* constituent un contexte très favorable à ce type d'analyse. La comparaison des réponses de Saint-Malo et de Molène face à la maladie a démontré une forte résistance des ormeaux de Saint-Malo (Dubief et al. 2017). En effet, ces deux populations, bien que peu éloignées géographiquement l'une de l'autre (~300 km) ont un historique bien différent concernant *V. harveyi*. L'une, Saint-Malo, a subi de fortes mortalités tandis que l'autre, Molène, a été épargnée du fait des températures moins élevées l'été et donc moins propices au développement de *V. harveyi* (Thébault 1998). En effet, *V. harveyi* n'est capable de provoquer la mort de l'ormeau qu'à partir d'une température de 17°C, température qui n'est que très rarement atteinte à Molène, mais largement dépassée à Saint-Malo l'été (Figure 1) (Huchette & Clavier 2004). S'il est fort probable que les fortes mortalités subies par Saint-

Malo à partir de 1998, ainsi que les températures estivales de l'eau de cette région ont joué un rôle important dans l'apparition de cette résistance, il est aussi possible que ces facteurs aient un impact sur les mécanismes épigénétiques de l'ormeau. Cependant, si un nombre grandissant d'études sur la méthylation de l'ADN a déjà été mené sur les invertébrés marins, aucune étude n'a été réalisée sur le genre *Haliotis*. L'espèce la plus proche d'*H. tuberculata* ayant été étudiée concernant la méthylation de l'ADN est l'escargot d'eau douce *Biomphalaria glabrata* dont la méthylation de l'ADN a été décrite comme ayant potentiellement un rôle fonctionnel dans la régulation de son expression (Fneich et al. 2013). *B. glabrata* étant très proche de l'ormeau, il est fort probable que *H. tuberculata* possède aussi ce mécanisme. En effet, tous les organismes ne semblent pas posséder un système de méthylation, comme chez *Caenorhabditis elegans* qui ne présente aucune 5-methylcytosine dans son génome (Harris et al. 2014; Simpson et al. 1986). Le but de cette étude est donc d'évaluer la présence de ce mécanisme et le possible rôle fonctionnel qu'il peut avoir chez *H. tuberculata* en analysant les séquences d'ARN issus de séquençage globale de l'ARN (RNAseq). Le but est d'analyser la présence et la distribution de certaines empreintes que laisse la méthylation des cytosines. En effet, quand une cytosine est méthylée, elle devient hyper-mutagène et a une forte probabilité de muter en thymine. Ce type d'erreur touchant les CpG est difficile à corriger par le mécanisme de réparation de l'ADN et peut donc être transmis lors de division cellulaire, marquant ainsi de manière durable la séquence d'ADN. Ce phénomène de méthylation et de mutation ne touche que le dinucléotide CpG et a pour conséquence de provoquer un appauvrissement de ce dinucléotide dans une séquence (Schorderet & Gartler 1992). Ainsi, les gènes ayant été le plus méthylés par le passé sont aussi ceux chez qui l'on observe un appauvrissement quantifiable en CpG. Ce type d'étude a déjà été menée sur plusieurs modèles (eg. Nanty et al. 2011; Gavery & Roberts 2013; Dimond & Roberts 2015). Cependant, l'originalité de la présente étude réside dans la comparaison de ces patterns de méthylations observés sur deux populations de la même espèce, proches, mais ayant subi de toute évidence des pressions environnementales bien différentes et pouvant donc potentiellement présenter des patterns d'appauvrissement en CpG différents.

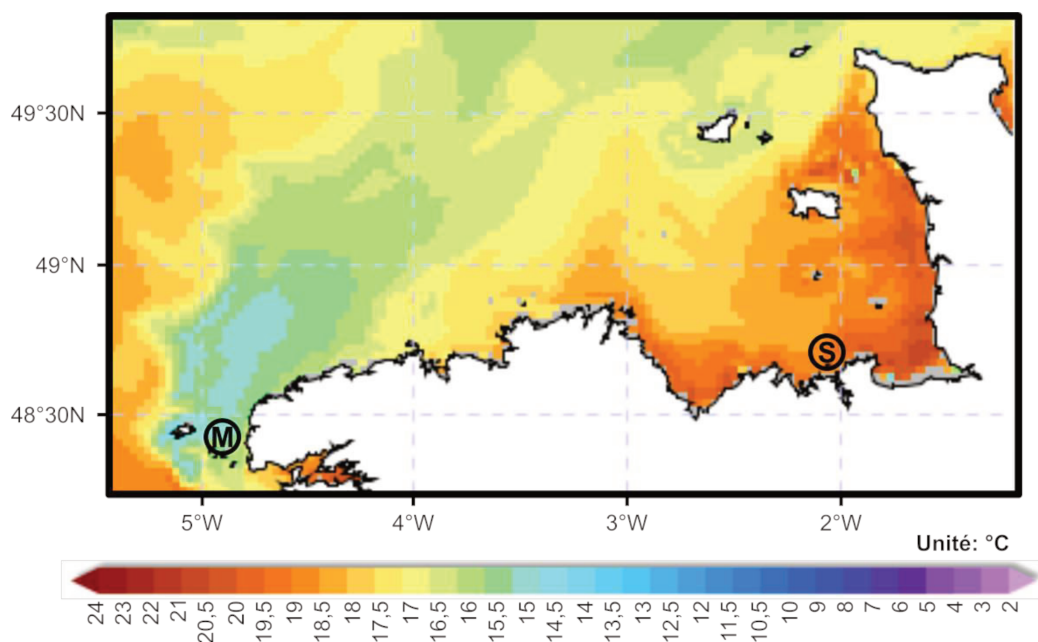


Figure 1: carte de température d'août 2016 en Bretagne nord issue de donnée de modélisation du site MARC (IFREMER) (<https://marc.ifremer.fr/>). M = Molène et S = Saint-Malo.

2. Matériels et méthodes

2.2 Séquençage, assemblage *de novo*

Cette étude a été réalisée en utilisant les données brutes de séquençage issues de l'étude d'expression différentielle présentée dans le Chapitre 2. Brièvement, l'ARN total d'hémolymphes d'ormeaux a été séquençé par un Illumina HiSeq 2000. Pour chaque population, les échantillons d'hémolymphes ont été prélevés sur 3 animaux infectés par *V. harveyi* (72 heure post-infection) et 3 animaux non infectés, soit 6 échantillons par population pour un total de 12 librairies. Les librairies ont été construites avec le kit « Truseq stranded mRNA kit » (Illumina, San Diego, USA) qui possède la particularité d'être brin spécifique. La présente étude ayant pour objectif de comparer les séquences d'ARN des deux populations, un assemblage *de novo* a été réalisé pour chacune d'entre elles en groupant les 6 échantillons (infectés et non infectés) et en utilisant les mêmes programmes et paramètres utilisés pour l'étude d'expression différentielle du Chapitre 2. En complément, une banque d'ADNc de *Caenorhabditis elegans* a été récupérée à partir de la base de données : « WormBase » (n° d'accès : WBcel235) afin d'observer la distribution des

CpGo/e sur une espèce connue pour être dépourvue de 5-méthylcytosine (Harris et al. 2014; Simpson et al. 1986).

2.3 Annotation et création des groupes fonctionnels de transcrits

L'annotation des deux assemblages a été effectuée avec les mêmes programmes et paramètres utilisés en Chapitre 2. Cependant, la base de données Uniref 90 ne permettant pas d'extraire les termes GO des résultats de Blast, elle n'a pas été utilisée. Ainsi, les deux transcriptomes ont été uniquement blastés contre la base de données Swiss-Prot qui permet une meilleure annotation et l'extraction des termes GO associés à chaque résultat de Blast. Les gènes impliqués dans le système de méthylation de l'ADN (DNMTs, MBDs, TETs) ont ainsi été recherchés dans ces deux transcriptomes annotés mais aussi dans le transcriptome global publié en 2016 et réunissant les données de séquençage de cette étude ainsi que d'une étude effectuée sur des larves d'*H. tuberculata* prélevés à 14h, 24h et 38h post-fécondation (Harney et al. 2016). En complément, ces gènes ont été recherchés dans le transcriptome d'*Haliothis rufescens* obtenu par De Wit & Palumbi (2013). Afin de s'assurer de la qualité et du sens 5'-3' des séquences, seulement les séquences annotées ont été retenues pour l'ensemble des calculs et représentations graphiques effectués dans cette analyse. De plus, le fait que le séquençage de ces échantillons ait été effectué en « brin spécifique » ajoute une assurance quant à la bonne orientation 5'-3' des transcrits obtenus. Le sens des séquences est très important car le dinucléotide observé dans cette analyse est bien CpG et non pas GpC. Les transcrits ont ensuite été classés dans différents groupes fonctionnels en fonction de leur terme GO associé avec l'aide du logiciel WEGO (Ye et al. 2006). Etant donné qu'un gène peut être associé à plusieurs termes GO à la fois, un même transcrit peut être présent dans deux groupes de gènes différents. Cependant, si la redondance de certains transcrits a été permise entre les groupes de terme GO, la redondance à l'intérieur de ces groupes n'a pas été permise de telle sorte que chaque transcrit n'est représenté qu'une seule fois au sein de chaque groupe. Compte tenu que certains gènes peuvent être présents dans le transcriptome d'une population mais absents de l'autre, ce qui pourrait biaiser quelque peu leur comparaison, les groupes fonctionnels de chaque population ont été filtrés afin de ne retenir que les gènes partagés par les transcriptomes des deux populations et assurer ainsi une comparaison cohérente entre

elles. Deux groupes de transcrits supplémentaires ont été construits pour chaque population et regroupant les gènes présents dans chacun des deux clusters extraits de l'analyse d'expression différentielle du Chapitre 2 (C1 et C2). Pour rappel, le cluster C1 réunit tous les gènes sur-exprimés seulement chez les individus infectés de Molène et qui sont donc associés à la sensibilité face à la vibriose. Le cluster C2 réunit tous les gènes observés comme étant sur-exprimés chez les individus infectés de Saint-Malo et sous-exprimés chez les individus infectés de Molène et qui sont donc associés à la résistance. Ces deux clusters regroupant les gènes les plus susceptibles d'être impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la maladie, il apparaît intéressant de comparer les patterns de méthylations de ces groupes de gènes entre les deux populations. La construction de ces deux groupes a été réalisée en extrayant la liste des identifiants Swiss-Prot des deux clusters C1 et C2 du transcriptome du Chapitre 2, afin de récupérer les gènes correspondant dans les transcriptomes de Saint-Malo et Molène.

2.4 Calcul des différents ratios et statistiques.

CpGo/e est défini comme le ratio entre le nombre de dinucléotides CpG observé sur la séquence et le nombre de CpG attendu compte tenu de la composition en C et G de la séquence ainsi que de sa longueur en nucléotides. Ainsi, cette valeur permet d'estimer une possible anomalie d'occurrence de ce dinucléotide imputable à l'hyper-mutabilité des CpG méthylés qui se transforment en TpG et appauvrissent donc la séquence en CpG. Pour chaque transcrit retenu pour cette analyse dans les deux populations, le ratio CpGo/e a été calculé selon la formule suivante (Matsuo et al. 1993), avec L = longueur du transcrit:

$$\text{CpGo/e} = \frac{\text{nombre de CpG}}{\text{nombre de C} \times \text{nombre de G}} \times \frac{L^2}{L - 1}$$

Ce même calcul a été effectué avec le dinucléotide GpC (GpCo/e) afin de s'assurer que cette anomalie d'occurrence en CpG ne soit pas le fait de différence de composition en G et C des séquences analysées. En effet, la méthylation des cytosines apparaît préférentiellement sur une cytosine suivie d'une guanine (CpG) induisant donc son hyper-mutabilité, et non pas sur une cytosine précédée d'une guanine (GpC). Ainsi, aucun mécanisme n'est susceptible de créer une anomalie d'occurrence sur ce dernier. Donc, si

une séquence présente une composition normale en C et G, les valeurs de GpCo/e des séquences analysées doivent présenter une distribution gaussienne avec une moyenne s'approchant de 1. Enfin, ce calcul a été effectué avec le dinucléotide TpG afin d'analyser la corrélation entre les valeurs de TpGo/e et CpGo/e. Etant donné que la méthylation de CpG induit sa mutation en TpG, cela devrait mener à une corrélation négative entre les valeurs de CpGo/e et TpGo/e.

Afin d'évaluer la distribution des valeurs de CpGo/e et GpCo/e, un modèle de mélange gaussien a été construit en utilisant la librairie « mixtools » du logiciel R (Young et al. 2007). Un test de corrélation de Spearman a été effectué entre les valeurs de CpGo/e et TpGo/e. Afin de comparer les moyennes de CpGo/e de chaque groupe fonctionnel de gènes entre elles, un test de Kruskal-Wallis suivie d'un test posthoc de Conover a été effectué. Enfin, des tests de Kolmogorov-Smirnov ont été effectués pour comparer les distributions de CpGo/e de chaque groupe fonctionnel entre les deux populations. Ce même test a été effectué pour comparer les distributions de CpGo/e des clusters C1 et C2 à la distribution du transcriptome global de Molène et de Saint-Malo individuellement ainsi que pour les distributions des clusters entre eux. L'ensemble des tests statistiques, calculs et représentations graphiques ont été effectués sur le logiciel R (R Core Team 2015).

3. Résultats

3.1 Assemblage et annotation des transcriptomes de Molène et Saint-Malo

Les assemblages des transcriptomes de Molène et Saint-Malo ont respectivement produit 53 651 et 56 285 transcrits avec des tailles moyennes de transcrits très similaires entre les deux permettant ainsi une bonne comparaison (table 1). L'annotation effectuée sur la base de données Swiss-Prot a permis l'identification de nombreux transcrits dont 16 654 et 16 967 ont été associés à des termes GO pour Molène et Saint-Malo respectivement. Ces deux listes ont donc été utilisées pour l'analyse de distribution de CpGo/e ainsi que pour les comparaisons de classes de gènes déterminées en fonction de leurs termes GO. Trois gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN ont été retrouvés dans les trois transcriptomes d'*Haliotis tuberculata* analysés (Molène ; Saint-Malo et le transcriptomes global): l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1) la « methyl-binding protein » (MBD2) et la « methylcytosine

dioxygenase » (TET2). Ces mêmes gènes ont été retrouvés dans le transcriptome d'*H. rufescens* hormis la TET2.

Table 1: Statistiques des transcriptomes de Saint-Malo et Molène. * indiquent les gènes qui ont été utilisés pour les analyses de CpGo/e

	Molène	Saint-Malo
Nombre de transcrits	53 651	56 285
Nombre de gènes	27 413	28 881
N50	1 952	1 943
Longueur moyenne des transcrits	1 511	1 498
Transcrit le plus long	32 601	32 765
Transcrit le plus court	500	500
Transcrits annotés	31 772	32 343
Transcrits avec Terme GO *	16 654	16 967

3.2 Distribution des valeurs de CpGo/e et GpCo/e

La distribution a été réalisée sur les listes de gènes ayant été affiliés à des termes GO. Les résultats étant similaires sur les deux populations, seulement les résultats de Saint-Malo seront présentés en graphiques ci-après. Les distributions des ratios CpGo/e et GpCo/e des 16 967 transcrits analysés sont présentés en Figure 2. La distribution des données de CpGo/e s'ajuste à un modèle de mélange gaussien avec deux composantes présentant les moyennes de 0,46 ($\pm 0,11$) et 0,75 ($\pm 0,14$) pour la population de Saint-Malo. Ces résultats sont quasiment identiques pour la population de Molène (composante 1 : 0,46 $\pm 0,10$; composante 2 : 0,75 $\pm 0,14$). La grande majorité des transcrits analysés présentent un ratio CpGo/e inférieur à 1 (98,79%). Au contraire, les données de GpCo/e s'ajustent parfaitement à une gaussienne unimodale dont la moyenne est de 0,88 ($\pm 0,11$), rejetant donc la possibilité que la distribution asymétrique observée sur les ratios CpGo/e soit dû à des différences de composition en G et C. En complément, la corrélation entre CpGo/e et TpGe/o a été testée et a montré une corrélation négative entre ces deux valeurs ($p\text{-value} < 0,001$ et $\rho = -0,49$). A titre d'exemple, le calcul de CpGo/e a été réalisé sur une banque d'ADNc de *C. elegans*, une espèce connue pour être dépourvue de 5' méthylcytosine dans son génome. Chez cette espèce, la distribution des CpGo/e s'ajuste à une gaussienne avec une valeur moyenne proche de 1 (0,94 $\pm 0,21$), ne montrant donc aucune anomalie d'occurrence en CpG dans ses séquences (Figure 3).

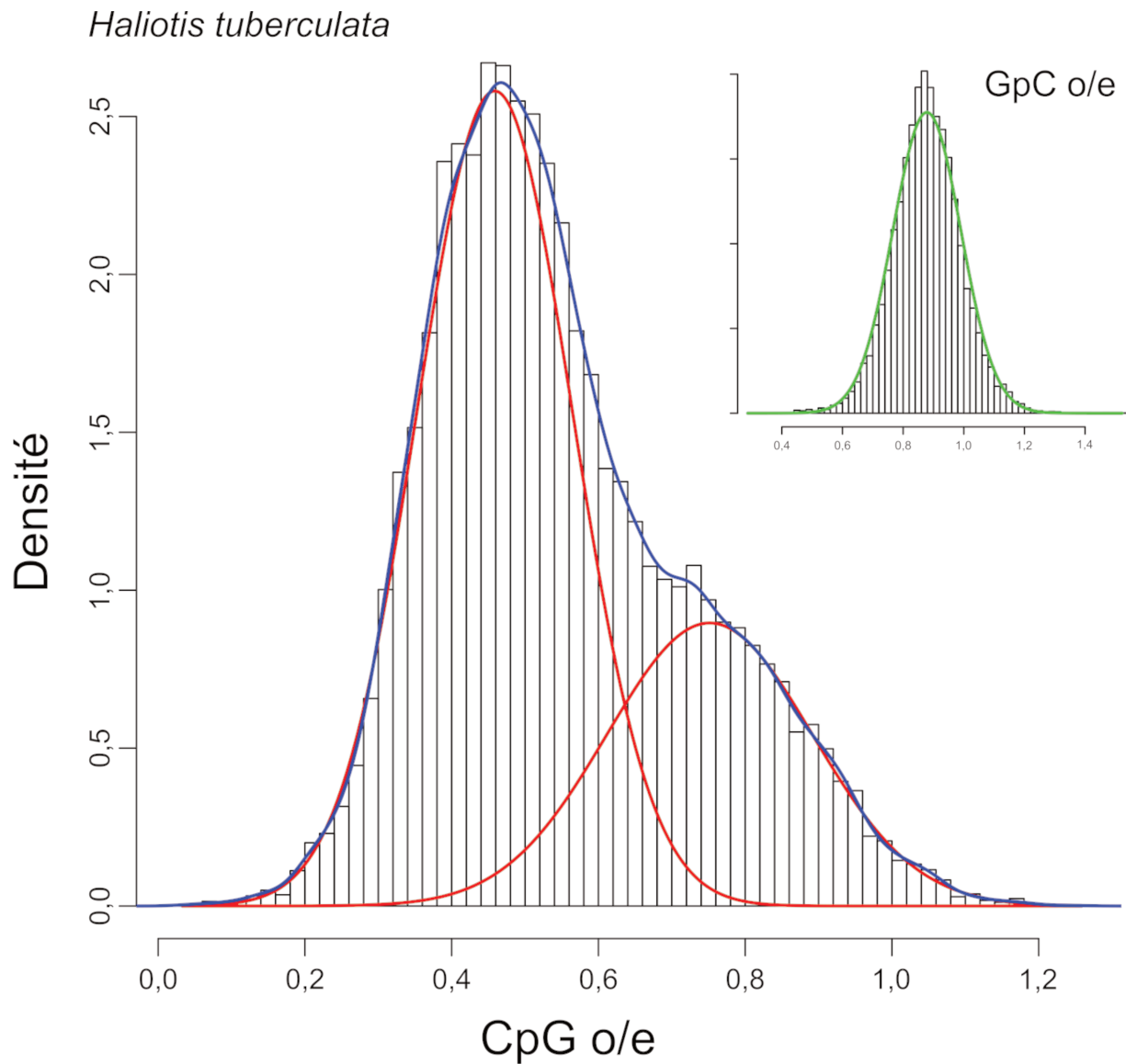


Figure 2: Distribution des valeurs de CpGo/e sur les 16 967 transcrits annotés de Saint-Malo ainsi que la distribution des valeurs de GpCo/e. Sur le graphique de CpGo/e, la courbe bleue représente la densité estimée et les courbes rouges représentent les deux composantes d'un modèle de mélange gaussien. Sur le graphique, la courbe verte représente la distribution gaussienne des valeurs de GpCo/e calculée selon les dimensions du jeu de données.

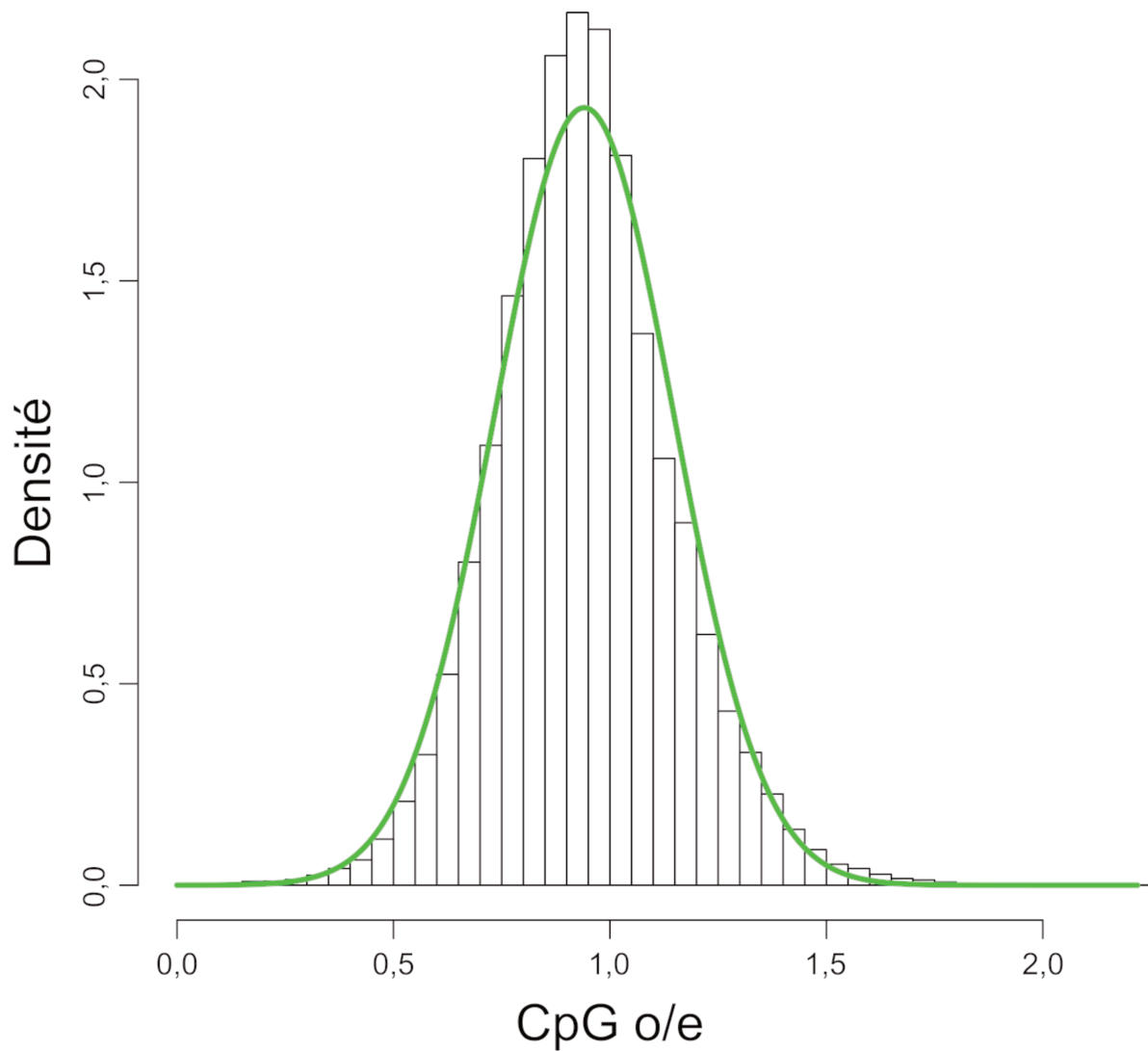


Figure 3: Distribution des valeurs de CpGo/e sur les 33 746 ADNc de *Caenorabditis elegans*. La courbe verte représente la distribution gaussienne des valeurs de GpCo/e calculée selon les dimensions du jeu de données.

3.3 Comparaison des classes de gène

Deux ensembles de groupes fonctionnels de gènes ont été formés et analysés séparément. Le premier (Figure. 4) est composé de fonctions impliquées dans des processus généraux comme le cycle cellulaire ou le transport ainsi que des fonctions plus spécifiques contenant des gènes inductibles comme la réponse au stress et le système immunitaire.

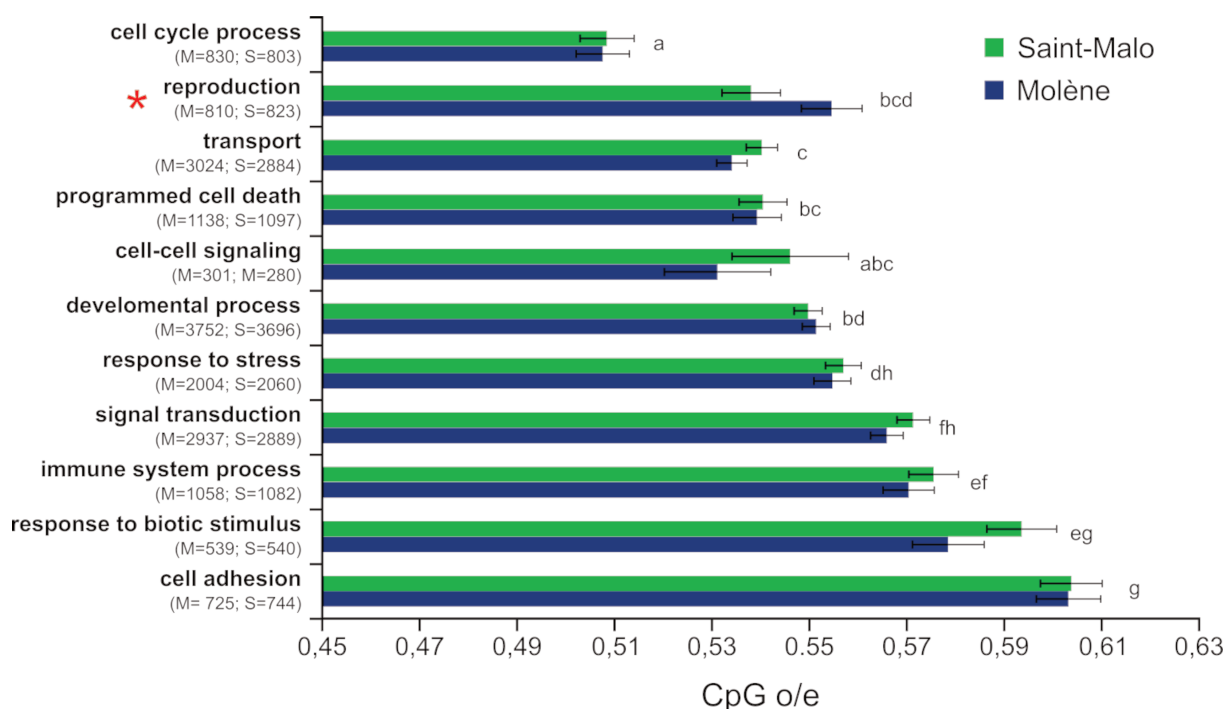


Figure 4: Valeur moyenne de CpGo/e par Terme GO de fonction générale. Les bars représentent l'erreur standard. Les nombres entre parenthèses indiquent les effectifs en nombre de transcrits pour Molène (M) et Saint-Malo (S). L'étoile rouge représente une différence significative entre les deux populations selon un test de Kolmogorov-Smirnov ($P < 0.05$). Les lettres indiquent les différences significatives entre les classes de gènes (les deux populations confondues) selon un test de Kruskal-Wallis suivie d'un test posthoc de Conover ($P < 0.05$).

Les termes GO analysés dans cet ensemble sont généraux et réunissent donc de nombreux gènes (et de nombreuses sous-classes de termes GO). La comparaison de ces classes entre elles affiche des différences significatives avec les valeurs minimum de CpGo/e observées pour le terme GO « cell cycle process » et le maximum pour « cell adhesion ». Cette structuration fonctionnelle des valeurs de CpGo/e vient expliquer la distribution bimodale observée précédemment avec certaines classes présentant des valeurs significativement plus faibles que d'autres. Les tests de Kolmogorov-Smirnov effectués au sein de chaque classe fonctionnelle pour comparer les valeurs obtenues dans chacune des populations ont permis de détecter une différence significative seulement pour le terme GO « reproduction » ($p\text{-value} = 0,032$). Le deuxième ensemble de groupes fonctionnels réunit des groupes sélectionnés en fonction des résultats d'expression différentielle présentés en Chapitre 2 (Figure 5), afin de cibler plus spécifiquement les classes de gènes possiblement impliquées dans la résistance de Saint-Malo face à *V. harveyi*. Les groupes fonctionnels analysés dans cet ensemble sont donc plus spécifiques et à des niveaux plus précis de la

classification en terme GO, ils présentent donc des effectifs beaucoup plus petits. Du fait de ces plus faibles effectifs, les erreurs standard calculées pour ces groupes sont beaucoup plus importantes. Les différences statistiques observées entre les groupes fonctionnels de cet ensemble indiquent aussi une distribution fonctionnelle des valeurs de CpGo/e parmi les groupes de gènes, mais cette structuration reste moins marquée que celle observée sur les groupes fonctionnels généraux du premier ensemble. Une différence significative est observée entre Molène et Saint-Malo pour le terme GO « réponse inflammatoire ».

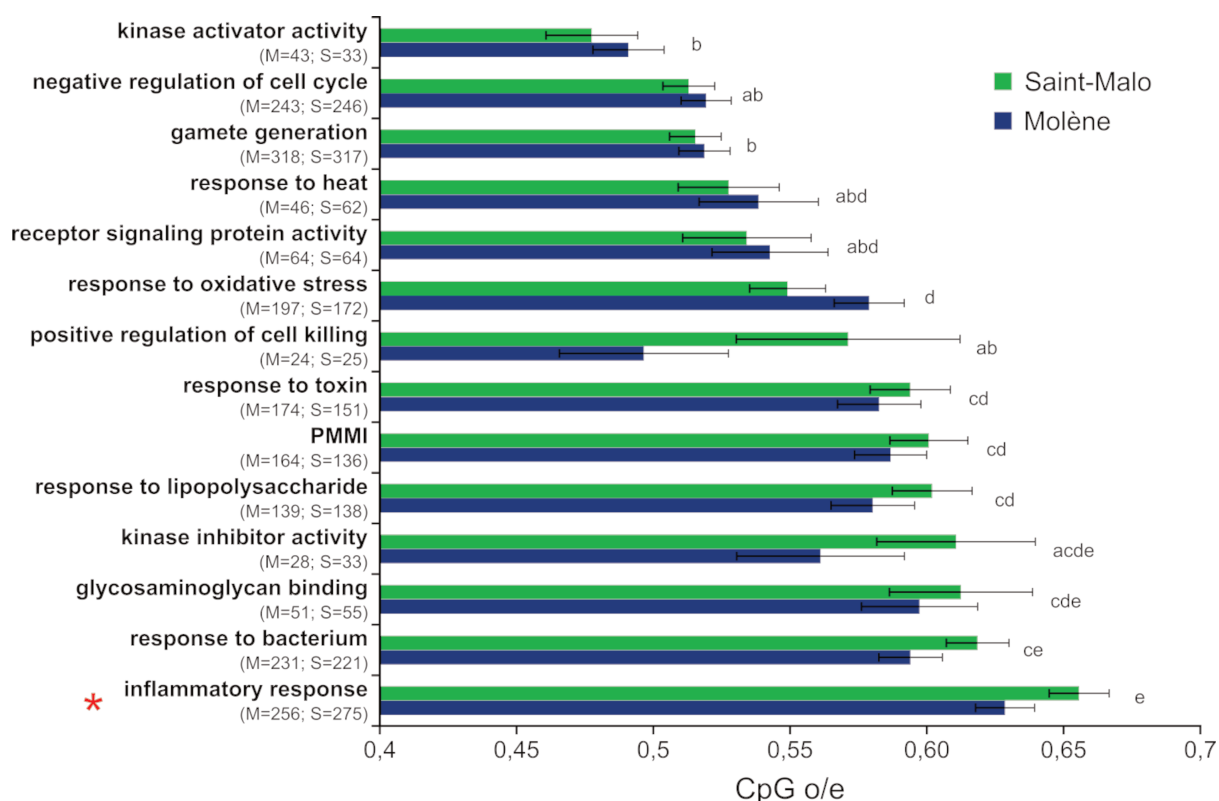


Figure 5: Valeur moyenne de CpGo/e par Terme GO spécifique à la réponse immunitaire. Les barres représentent l'erreur standard. Les nombres entre parenthèses indiquent les effectifs en nombre de transcrits pour Molène (M) et Saint-Malo (S). PMMI = « Production of Molecular Mediator of Immune response ». L'étoile rouge représente une différence significative entre les deux populations selon un test de kolmogorov-smirnov ($P < 0.05$). Les lettres indiquent les différences significatives entre les classes de gènes (les deux populations confondues) selon un test de Kruskal-Wallis suivie d'un test posthoc de conover ($P < 0.05$).

Les deux clusters C1 et C2 présentent des moyennes très similaires entre les deux populations et ne sont pas significativement différents (C1 : Molène = 0,6654 et Saint-Malo = 0,6626 ; C2 : Molène = 0,6455 et Saint-Malo = 0,6443). Pour les deux populations, les

distributions des deux clusters sont significativement différentes de celles de leur transcriptome respectif. On observe un décalage de leur profil vers des valeurs plus hautes de CpGo/e. De plus, la comparaison des clusters C1 et C2 au sein de chaque population a montré une différence significative chez Saint-Malo ($p\text{-value}= 0.022$). Cette différence n'est pas observée chez Molène à strictement parlé, cependant, la $p\text{-value}$ observée reste très proche du seuil de 5% ($p\text{-value}= 0,051$).

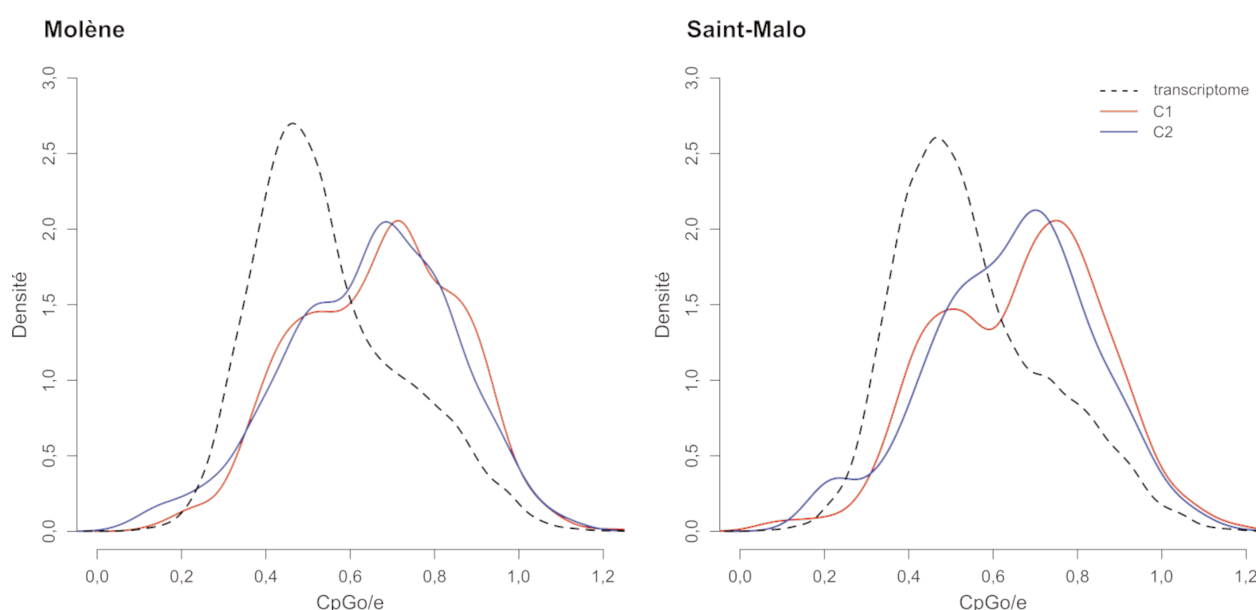


Figure 6: Distribution des valeurs de CpGo/e des transcriptomes globaux de Molène et de Saint-Malo ainsi que des clusters C1 et C2.

4. Discussion

N'existant aucune information concernant la méthylation de l'ADN au sein du genre *Haliotis*, le principal objectif de cette étude était d'évaluer si ce mécanisme existe chez *Haliotis tuberculata* et s'il peut avoir une valeur fonctionnelle. En effet, si la présence de ce mécanisme a bien été observée chez une espèce de gastéropode *B. glabrata* (Fneich et al. 2013), son étude chez plusieurs espèces a montré une variabilité importante de profil de méthylation au sein du règne animal et végétal, allant d'organismes où le taux de 5-méthylcytosine est très important comme chez les mammifères à d'autres organismes où ce taux est extrêmement faible comme chez *Drosophila melanogaster*, voire inexistant comme

chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Simpson et al. 1986; Jabbari & Bernardi 2004). Si les mécanismes de méthylation ainsi que leurs distributions dans les génomes des invertébrés sont très variables, ceux-ci partagent néanmoins la caractéristique de présenter leur méthylation majoritairement dans les zones intragéniques ce qui rend les données de RNAseq adaptées à ce type d'étude. Au vue de la distribution des valeurs de CpGo/e observées dans la présente étude, on peut affirmer que la majorité des séquences d'*H. tuberculata* sont appauvries en CpG. Celle-ci présente une distribution bimodale similaire à ce qui a été observée chez l'huître *C. gigas* (Gavery & Roberts 2010). De plus, la forte corrélation négative observée entre CpGo/e et TpGo/e confirme l'hypothèse selon laquelle cet appauvrissement en CpG est bien dû à l'accumulation de mutations de CpG en TpG au fil des générations. Autant chez les vertébrés que chez les invertébrés, la forte corrélation négative entre le niveau de méthylation de l'ADN et le rapport CpGo/e a clairement été démontrée (Suzuki et al. 2007; Elango & Yi 2008). La distribution de cette valeur dans le transcriptome de *C. elegans* présentée en Figure 3 en est un exemple frappant. En effet, cette espèce est connue pour être dépourvue de 5-méthylcytosine, et ne subit donc pas de mutation de ces CpG, ce qui a pour résultat la distribution gaussienne des CpGo/e dont la moyenne approche la valeur de 1. *H. tuberculata*, affiche donc un profil similaire à ce qui a déjà été observé chez d'autres mollusques tels que *Chlamys farreri*, *C. gigas* ou encore *B. glabrata* (Shanshan et al. 2015; Gavery & Roberts 2010; Fneich et al. 2013), indiquant que la méthylation de l'ADN se produit chez l'ormeau. La comparaison des différentes classes fonctionnelles de gènes a révélé un appauvrissement en CpG significativement différent entre elles, que ce soit au niveau des classes générales de gènes (Figure 4) ou de classes plus spécifiques à la réponse à la vibriose quoique la structuration de ces dernières soit moins évidente (Figure 5). Ce résultat montre donc une répartition fonctionnelle des patterns de méthylation et donne une preuve supplémentaire de l'implication de ce système dans la régulation de l'expression des gènes d'*H. tuberculata*. Comme il a été observé chez *C. gigas* et d'autres invertébrés, les classes estimées comme étant les plus méthylées réunissent des gènes de ménage comme des gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou le transport de molécules, tandis que les classes de gènes de nature plus inductibles comme le système immunitaire où les réponses au stress présentent une prédiction d'hypo-méthylation (Figure 4) (Gavery & Roberts 2010; Rivière et al. 2014). Ce constat est renforcé par la distribution des CpGo/e des clusters C1 et C2 (Figure 6). En effet, ces deux clusters réunissent des gènes

qui ont été induits par une infection par *V. harveyi* et l'on observe que leur taux de CpGo/e est significativement plus haut en comparaison de la distribution globale des CpGo/e des transcriptomes de chaque population. Ce type de résultat a déjà été observé chez les coraux, du genre *Acropora* chez qui les gènes dont l'expression est induite par les changements globaux (température, acidification) sont prédits comme étant hypo-méthylés en comparaison de leur transcriptome global (Dimond & Roberts 2015). Les raisons des différences de méthylation intragéniques entre gènes inductibles et gènes de ménage chez les invertébrés restent aujourd'hui en discussion. Plusieurs hypothèses sont cependant à l'étude et impliquent ces méthylations dans la régulation de la transcription ainsi que de l'épissage alternatif ou encore dans l'expression stochastique de variant d'épissage (Gavery & Roberts 2014). Des études plus approfondies de leur impact chez l'ormeau sont nécessaires pour tenter d'expliquer leur implication chez cet animal. Il est intéressant d'observer que les distributions de CpGo/e de ces deux clusters sont significativement différentes entre elles. Il faut rappeler que l'intérêt de ces deux clusters de gènes diffère quant à leur implication dans la réponse à la vibriose : C2 est associé à la résistance de Saint-Malo, alors que C1 est associé à la sensibilité de Molène. Ainsi, ces différences de CpGo/e suggèrent un historique de méthylation différent des gènes associés à la résistance, en comparaison de ceux associés à la sensibilité.

Il est admis aujourd'hui que l'environnement est capable de moduler le méthylome des animaux possédant ce mécanisme. Ceci a été démontré de manière très intéressante chez l'abeille *Apis mellifera* (Kucharski et al. 2013). Chez cette espèce, une larve peut donner une reine fertile ou une ouvrière selon si elle est nourrit toute sa vie avec de la gelée royale (reine) ou pas (ouvrière). Cependant, l'extinction du gène de la DNMT3 sur ces larves a pour effet de les faire évoluer en reine sans apport de gelée royale, démontrant ainsi l'impact de l'environnement (gelée royale) sur le système de méthylation de l'abeille, et donc l'impact de ce dernier sur le développement de phénotype très différent. L'impact de facteurs environnementaux sur l'épigénome a aussi été bien documenté chez les plantes ainsi que chez l'homme (Yu et al. 2013; Pacchierotti & Spanò 2015). Les deux populations étudiées dans la présente étude sont issues d'environnements proches géographiquement mais très différents en termes de température estivale (Figure 1) et donc d'exposition à *V. harveyi*. La comparaison entre ces deux populations a révélé des différences significatives pour deux des

groupes de gènes formés : la reproduction et la réponse inflammatoire. Les résultats d'expression différentielle effectués sur ces deux populations (Chapitre 2) ont suggéré une implication de la réponse inflammatoire dans la résistance de Saint-Malo par l'activation de la voie NF- κ B, tandis qu'une inhibition de cette voie est observée chez Molène. Il apparaît donc cohérent que les profils de CpGo/e soient différents entre les deux populations.

La reproduction est aussi un processus qui revêt une importance capitale dans le développement de la vibriose chez l'ormeau, et la différence observée entre les profils de CpGo/e des deux populations concernant cette classe de gènes peut se révéler particulièrement intéressante. En effet, le lien entre reproduction et susceptibilité à la vibriose chez l'ormeau a clairement été démontré. Travers et al. (2009) ont observé une réduction significative des mortalités chez des ormeaux immatures (40%) comparés à des ormeaux matures (85%) en condition d'infection par *V. harveyi* en baignade. Il a aussi été observé une dépression globale de leur système immunitaire durant leur gamétogénèse (M.-A. Travers, Le Goïc, et al. 2008). Chez des animaux à stratégie r ou stratégie reproductive, comme chez l'ormeau dont le succès reproducteur repose sur l'émission d'une quantité considérable de gamètes, la reproduction représente un coût énergétique extrêmement important, réduisant, durant cette période, leur capacité de résistance au stress. Ainsi, la gestion de l'effort de reproduction peut être déterminante dans la capacité de résistance à une maladie, comme cela a été démontré concernant les mortalités estivales de *C. gigas* pour qui une corrélation positive entre effort de reproduction et mortalité a été observée (Delaporte et al. 2007; Decker et al. 2011). Le travail effectué sur les réponses immunitaires de Saint-Malo et Molène montre une réponse à l'infection beaucoup plus efficace chez Saint-Malo. L'une des raisons pouvant expliquer cette meilleure réponse pourrait être la différence d'allocation d'énergie dans la reproduction : traduisant un compromis énergétique plus favorable chez Saint-Malo à l'expression d'une réponse immunitaire efficace quand vient la période des mortalités. Ainsi, dans l'hypothèse que la méthylation de l'ADN d'*H. tuberculata* a bien un impact sur la régulation de l'expression de ses gènes, on peut supposer que la différence des profils de méthylation des gènes de la reproduction observée entre Molène et Saint-Malo peut être liée à une régulation différente de l'effort de reproduction au cours de l'année entre ces deux populations. Il est difficile d'évaluer à quelle échelle de temps s'accumule les mutations dues à la méthylation des cytosines et causant

l'appauvrissement des séquences génétique en CpG. Il nous est donc impossible de déterminer si les différences de profils de CpGo/e observées entre Molène et Saint-Malo sont dues aux mortalités de Saint-Malo vieilles de seulement 20 ans, ou plutôt par des différences environnementales globales, telle que la température, ayant impactées différenciellement la méthylation de ces deux populations depuis de plus nombreuses générations.

Le système de méthylation de l'ADN nécessite un ensemble d'enzymes : les DNMTs ainsi que les protéines MBDs. Chez les métazoaires, les DNMTs sont classés en trois groupes : Les DNMT1, DNMT2 et DNMT3 qui n'ont pas les mêmes fonctions. Les enzymes DNMT3 sont considérées comme étant les principales responsables de la méthylation *de novo* des cytosines (la DNMT2 présente une faible activité de méthylation) (Okano et al. 1999) tandis que le rôle de la DNMT1, non moins important, est de conserver ces méthylations lors de la division cellulaire et joue donc un rôle dans la transmission héréditaire de marques épigénétiques (Law & Jacobsen 2010). La MBD est aussi très importante car elle se lie spécifiquement aux 5-methylcytosines ce qui est indispensable au rôle fonctionnel de ces méthylations. Elles sont d'ailleurs fréquemment exprimées conjointement avec les DNMT (Y. Zhao et al. 2013). On retrouve la DNMT1 ainsi que la MBD2 chez les deux espèces d'ormeaux analysées : *H. tuberculata* et *H. rufescens*. Cependant, la DNMT3 n'a été identifiée dans aucun des transcriptomes analysés. La variabilité des profils de méthylation semble particulièrement important lors des stades larvaires, suggérant une activité importante de la DNMT3 durant ces phases de développement, du moins chez l'huître (Riviere et al. 2013). C'est pour cette raison que ce gène a été cherché dans le transcriptome globale en complément des transcriptomes d'hémolymphe d'ormeaux de Molène et Saint-Malo, car celui-ci contient les données RNAseq obtenues à partir de larves d'ormeaux prélevées à 14, 24 et 38 heures post-fertilisation. Toutefois, l'expression des DNMTs est tissus spécifique et les stades les plus méthylés observés chez l'huître sont antérieurs au stade larve trocophore correspondant à 13 heures post-fertilisation chez l'ormeau (Belhsen 2000). Il est donc possible que les tissus et les stades de développement analysés n'aient pas permis l'observation de cette enzyme. Cependant, bien que cette méthyltransférase est décrite dans la littérature comme étant primordiale dans le système de méthylation de l'ADN, *H. tuberculata* ne serait pas le seul organisme présentant un

système de méthylation fonctionnel tout en étant dépourvu de DNMT3. En effet, c'est le cas de plusieurs espèces d'insectes mais aussi du gastéropode *B. glabrata* qui est une espèce très proche de l'ormeau (Fneich et al. 2013). L'absence de DNMT3 n'est pas commune chez les mollusques bivalves et le mécanisme de méthylation *de novo* chez les espèces qui en sont dépourvues n'est pas très bien caractérisé. L'une des hypothèses serait que cette méthylation *de novo* serait effectuée par la DNMT1, ce qui est le cas dans des cellules cancéreuses chez l'homme (Jair 2006). De plus, il faut noter que le rôle de la DNMT1 n'est pas forcément le même entre différents organismes. En effet, l'étude de l'évolution des gènes de la méthylation a démontré à plusieurs reprises la divergence fonctionnelle de certains d'entre eux au cours de l'évolution, comme la MBD2 qui est retrouvée chez *C. elegans* mais dont l'évolution lui a ôté toute activité liée à la méthylation (Gutierrez & Sommer 2007; Gutierrez & Sommer 2004). Enfin, le domaine oxygénase de la famille des « Ten Eleven Translocation enzymes » (TET) a été retrouvé dans les deux transcriptomes d'hémolymphe (Molène et Saint-Malo). Ce même domaine a été détecté chez *B. glabrata* (Fneich et al. 2013). Cette famille de gènes code pour des oxygénases qui catalysent la transformation de 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine et qui constituent un intermédiaire dans le processus de déméthylation chez les vertébrés (Ichiyama et al. 2015). En effet, la MBD2 et la DNMT1 ont une affinité réduite pour la 5-hydroxyméthylcytosine, pouvant donc mener à la diminution de l'impact de la méthylation ainsi qu'à la déméthylation de la cytosine en question (Law & Jacobsen 2010). Cependant, le taux de recouvrement des blasts de ce gène n'étant que de 50% pour les TET de l'humain, une caractérisation plus précise de ce gène et de son activité chez *H. tuberculata* est nécessaire pour affirmer sa possible implication dans la déméthylation chez cette espèce.

5. Conclusion

Cette étude est la première à explorer le système de méthylation de l'ormeau européen *H. tuberculata* mais aussi celui de l'ensemble du genre *Haliotis*. L'ensemble des résultats suggère fortement la présence d'un système fonctionnel de méthylation chez l'ormeau. Au sein de la classe des gastéropodes, le seul autre modèle ayant été étudié est l'escargot d'eau douce *B. glabrata* et les caractéristiques du système de méthylation observées dans la présente étude semblent suggérer des similarités avec le système de ce

dernier. L'absence de DNMT3 observée conjointement chez l'ormeau et *B. glabrata* suggère l'existence d'un système de méthylation spécifique à la classe des gastéropodes. Cette étude est aussi la première, à notre connaissance, à tenter de comparer les profils de méthylation par la méthode des CpGo/e, entre deux populations de la même espèce. Les résultats semblent indiquer des différences dans l'historique de méthylation des gènes des populations de Saint-Malo et Molène selon les classes de gènes ce qui pourrait être mis en lien avec, leur capacité différente de résistance face à la vibriose, ou plus simplement avec une manière différente de répondre aux stimuli environnementaux. Cette étude ouvre ainsi une nouvelle voie de recherche dans la caractérisation de la réponse de l'ormeau à son environnement, et un travail important reste à faire pour déterminer plus précisément l'impact des processus épigénétiques sur la régulation de ses gènes ainsi que sur la variabilité phénotypique qu'il peut induire chez cette espèce.

DISCUSSION

Le réchauffement climatique est un phénomène global qui a le potentiel de déstabiliser les interactions entre espèces. De très nombreux exemples suggèrent un rôle important du réchauffement dans l'émergence de maladies. En effet, l'augmentation rapide de température change « les règles du jeu » dans les interactions hôte-pathogène, favorisant dans certains cas l'hôte, mais la grande majorité du temps le pathogène lequel présente des forts taux de mutations et donc des processus évolutifs plus rapides (Wielgoss et al. 2013). L'émergence des mortalités de l'ormeau européen *H. tuberculata*, causée par *V. harveyi* en est un exemple typique. Du fait de l'intérêt économique que représentait cette espèce et du développement de structures d'élevage dont elle faisait l'objet, cette maladie a été bien étudiée. Les études qui ont été réalisées précédemment ont visé principalement à caractériser l'étiologie de cette maladie. Elles ont aussi déterminé certains des facteurs de susceptibilité de l'ormeau permettant d'expliquer le soudain succès infectieux de *V. harveyi*. La présente étude vise quant à elle à déterminer les facteurs de résistance de l'ormeau face à cette maladie. C'est de cet objectif qu'est née l'idée d'analyser la variabilité phénotypique de populations naturelles en termes de réponse à la maladie. L'identification d'une population particulièrement résistante a donc conduit à orienter ce travail vers la comparaison de deux populations contrastées en termes de mortalités, l'une résistante (Saint-Malo) et l'autre au contraire très sensible (Molène). Ces deux populations représentent donc un excellent modèle pour étudier les facteurs pouvant permettre l'expression d'une résistance face à une maladie émergente.

Afin de déterminer les facteurs principaux permettant à une population naturelle de présenter cette résistance accrue, plusieurs approches ont été réalisées sur des échantillons obtenus lors de deux expériences d'infections expérimentales successives. En voici un petit résumé permettant de replacer l'obtention de ces résultats dans le contexte chronologique dans lequel ils ont été obtenus.

Une première expérience (présentée dans le deuxième chapitre de ce travail) a été réalisée pour tester l'hypothèse de différences de taux de survie entre trois populations naturelles face à une exposition à *V. harveyi*, potentiellement causées par des pressions de sélection différentielle induites par les mortalités contrastées lors de la période des

épizooties (1998 à 2008). Suite à la première des trois infections successives que comportait cette première expérience, la population de Saint-Malo a montré une capacité de résistance remarquable avec un taux de survie de 95% au 24ème jour post-infection contre seulement 51% pour la population de Molène. Une approche de RNAseq a donc été réalisée afin d'observer la réponse globale des hémocytes de ces deux populations durant une infection. L'analyse de ces données n'a été effectuée qu'après la réalisation d'une seconde série d'infections expérimentales

Lors de cette seconde expérience (présentée dans le premier chapitre de ce travail), les capacités de résistance de Saint-Malo ayant déjà été démontrées, le schéma expérimental a pu être pensé de manière à exploiter cette caractéristique dans l'étude de la réponse immunitaire face à la maladie. Le fait de disposer d'une population résistante a été un atout considérable dans cette étude. Cela a d'ailleurs permis de mettre en évidence un effet de priming immunitaire lors d'une exposition classique.

Cette partie de ce manuscrit vise à discuter les principaux résultats de cette étude dans l'optique d'en déterminer les perspectives.

Résistance

Résistance et virulence

Les analyses de la réponse immunitaire présentées en première partie et les analyses transcriptomiques de la deuxième partie présentent des résultats cohérents entre eux, mais aussi avec les études antérieures. La présence de la population sensible dans cette analyse permet de pointer les mécanismes impactés par l'infection dans le cas d'une réponse sensible mais qui ne le sont pas dans le cas de la réponse résistante, en particulier dans le cas de l'analyse transcriptomique. Par ailleurs, Molène étant très sensible à l'infection, les résultats de son expression de gènes peuvent être mis en lien avec les études antérieures qui ont été faites avec des ormeaux d'élevage et des baies de Brest et Roscoff, qui montraient une grande susceptibilité à la vibriose (Cardinaud et al. 2015; Travers, Bouffant, et al. 2009; Travers et al. 2010).

Comme cela a déjà été démontré sur ce modèle, l'exposition des ormeaux à *V. harveyi* provoque une inhibition importante de la phagocytose. Travers et al. (2009) ont mis en évidence la capacité de la souche pathogène de *V. harveyi* à provoquer une diminution du taux de phosphorylation de la p38 MAPK provoquant une inhibition de la phagocytose ainsi que de la production de ROS. Dans la présente étude, il a été démontré que les ECPs produits par *V. harveyi* sont capables d'inhiber la phagocytose. Il serait intéressant d'évaluer si les ECPs seuls, sont capables de provoquer cette inhibition de la phosphorylation de la p38 MAPK. Par ailleurs, si l'étude de Travers et al. (2009) montre une inhibition de la phosphorylation de la p38, elle ne permet pas de déterminer à quel stade de cette voie de signalisation l'inhibition se fait. Il faut noter que la p38 est un messager dans la voie de transduction du signal, dont l'activation par phosphorylation est induite en amont par différents effecteurs qui eux-mêmes doivent être activés par les TNFs (pour « Tumor Necrosis Factor ») (Lee et al. 2012) comme FasL, surexprimé à Saint-Malo ou encore par des récepteurs membranaires comme les TLRs (pour visualiser la voie, Moreira et al. 2012). Or l'un des résultats les plus frappants dans l'analyse transcriptomique est le manque d'expression de gènes liés à la reconnaissance chez Molène, tandis que de nombreux PRRs ont été retrouvés surexprimés chez Saint-Malo. Ce potentiel manque d'activation de facteur de reconnaissance pourrait expliquer le retard dans l'activation de la p38 observé par Travers et collaborateurs, empêchant en amont l'activation des effecteurs responsables de la phosphorylation de la p38 MAPK et donc des réponses que cette dernière est censée déclencher, à savoir la phagocytose et la production de ROS.

Chez Saint-Malo, plusieurs gènes impliqués dans l'activation de la phosphorylation de l'IKB kinase (IKK) sont surexprimés. L'IKK est une enzyme qui joue un rôle crucial dans la régulation de la voie NF- κ B. Une fois activée, l'IKK va à son tour libérer NF- κ B de son inhibiteur (IKB) permettant ainsi sa translocation dans le noyau et l'induction d'expression de gènes de l'immunité (comme la réponse inflammatoire mais aussi anti-apoptotique) (Baeuerle & Henkel 1994). L'expression de ces gènes, activateurs de l'IKK, chez Saint-Malo est cohérente avec l'observation des nombreux PRRs qui sont impliqués dans l'activation de la voie NF- κ B. Cependant, aucun gène de ce type n'est surexprimé à Molène ce qui peut s'expliquer par l'apparente absence d'expression de PRRs chez cette population. Cependant, on retrouve la sur-expression de l'IKB chez cette population qui est souvent considérée dans

la littérature, comme étant la preuve de l'activation de NF- κ B (IKB peut être exprimée par la NF- κ B elle-même pour s'autoréguler et éviter une réponse trop forte : son expression est donc un signe de l'activité de NF- κ B) (X. Zhang et al. 2014). Ceci est très surprenant car aucun gène exprimé chez cette population ne laisse supposer une activation de cette voie. De plus, il a déjà été observé chez une population sensible, l'inhibition de la rel/NF- κ B au bout de 24 heures d'exposition ainsi qu'une diminution de la production de ROS et de la phagocytose (Cardinaud et al. 2015). Ce faisceau de preuves laisse penser que la NF- κ B serait plutôt inhibée dans le cas d'une réponse sensible. Cependant, les connaissances actuelles de ce mécanisme chez *H. tuberculata* ne permettent pas de déterminer si cette voie est activée ou inhibée dans ce cas. Les informations récoltées lors de cette analyse transcriptomique suggèrent toutefois que cette voie est fortement modulée par *V. harveyi* mais la complexité des interactions entre les gènes cibles ne permet pas de conclure sur les voies préférentielles impliquées dans le phénomène de résistance et/ou de susceptibilité de l'ormeau. Il apparaît donc important d'étudier plus spécifiquement la voie NF- κ B dans le cadre de cette maladie afin de déterminer le réel impact de la bactérie sur cette voie.

Chez les bactéries, il existe différentes stratégies pour survivre et se développer au sein de son hôte. Beaucoup d'entre elles consistent à perturber la réponse immunitaire. Par exemple *V. aestuarianus* produit des ECPs qui inhibent la phagocytose et l'adhérence des hémocytes d'huître grâce à une métalloprotéase (Labreuche et al. 2010). Chez l'humain, *V. parahaemolyticus* est capable d'empêcher le bon déroulement de la voie de signalisation de la MAPK, de la p38 et de la JNK en modifiant les MKK1 et MKK6, responsables de l'activation de ces voies par phosphorylation (Gur-Arie & Rosenshine 2015). D'autres encore sont capables d'empêcher le processus apoptotique de se mettre en place en l'inhibant et en activant artificiellement la voie NF- κ B (Raymond et al. 2013). Les analyses effectuées dans ce travail ainsi que les études antérieures ont mis en évidence quatre processus moléculaires qui potentiellement peuvent être impactés/modifiés par les facteurs de virulence de *V. harveyi* : la reconnaissance (PRRs), la voie NF- κ B, la voie des p38 MAPK et l'apoptose. Concernant cette dernière voie, la population de Molène a montré l'expression de nombreux effecteurs contradictoires, laissant un doute quant au déclenchement de l'apoptose tandis que le déclenchement de ce processus semble plus probable chez Saint-Malo avec de nombreux TNFs sur-exprimés de manière importante. Les études antérieures

réalisées sur des populations sensibles ainsi que les résultats de THC présentés en deuxième partie laissent penser qu'il n'y a pas de déclenchement important d'apoptose durant l'infection (aucune diminution significative de la THC durant l'infection). Pourtant, l'expression de gènes observée chez Molène suggère que cette voie est très impactée par l'infection avec l'expression d'effecteurs anti-apoptotiques mais aussi apoptotiques suggérant une ingérence de *V. harveyi* dans cette voie. De plus, il est étonnant d'observer une activité de la voie NF- κ B alors qu'aucun effecteur de Molène ne semble être impliqué dans son activation, soulevant une fois de plus la possibilité d'une manipulation par la bactérie. L'apoptose peut être un facteur de résistance pour l'hôte car il permet la destruction des bactéries phagocytées sans déclencher de réaction inflammatoire potentiellement dangereuse pour l'hôte or la voie NF- κ B a une activité anti-apoptotique. Du côté de la bactérie l'inhibition de l'apoptose peut être crucial pour sa survie, d'où le fait que certaine induise l'activation de la voie NF- κ B chez leur hôte. Ce type de perturbation repose souvent sur l'injection de facteurs de virulence directement dans le cytoplasme grâce à un système bien particulier : le système de sécrétion de type III (T3SS). Or *V. harveyi* possède ce système de sécrétion qui lui-même est sous le contrôle du « quorum sensing » (Henke & Bassler 2004). Il est possible que le T3SS de *V. harveyi* soit impliqué dans les réponses observées pendant l'infection. Une meilleure connaissance des facteurs de virulence de *V. harveyi* comme l'implication de ce T3SS, permettrait donc une meilleure interprétation des réponses transcriptomiques observées lors d'une infection. Par ailleurs, les ECPs de cette bactérie ont montré leur capacité à interférer avec la réponse hémocytaire. La caractérisation protéique du secrétome de *V. harveyi* pourrait donner des informations importantes sur les réponses différentielles de Saint-Malo et Molène face à de potentielles exotoxines (Madec et al. 2014). Il faut noter que très peu d'informations sont à ce jour disponible quant aux mécanismes fins cellulaires et moléculaires de l'interaction entre *V. harveyi* et les hémocytes. Ce travail a permis de démontrer que cette bactérie peut effectivement être phagocytée par les hémocytes d'ormeaux. Cependant, rien ne permet de déterminer si cette phagocytose se traduit par l'élimination de la bactérie par la formation de phagolysosome ou par apoptose.

En résumé, les données issues d'analyses transcriptomiques permettent de mettre en évidence des réponses très différentes concernant les voies de l'apoptose et NF- κ B, entre

les ormeaux de Molène et de Saint-Malo. L'apoptose est un processus qui peut jouer un rôle important dans la résistance, et les données suggèrent une stimulation plus importante de la voie extrinsèque de l'apoptose chez les ormeaux de Saint-Malo. Cependant il est difficile de donner une réponse définitive quant à son activation et/ou son inhibition chez ces deux populations. Cela nécessite donc une étude plus approfondie des effecteurs impliqués. Les pathogènes étant capables de manipuler directement les voies de l'apoptose et NF- κ B, une étude plus centrée sur le suivi d'effecteurs de l'apoptose durant une infection couplée à une étude des mécanismes de virulence de *V. harveyi* permettrait donc de répondre à ces questions.

La résistance de la population d'ormeaux originaire de Saint-Malo

Les résultats de mortalités obtenus lors des deux expérimentations menées dans cette étude ne laissent aucun doute quant à la résistance de Saint-Malo face à la maladie. Cette population était en effet déjà pressentie comme étant résistante par les acteurs professionnels et scientifiques normands présents sur le terrain depuis 1998 (Basuyaux, Comm. Pers.). Elle a effectivement subi de fortes mortalités par le passé mais semble avoir retrouvée un équilibre depuis, avec des effectifs importants, comme le suggère l'activité de pêche professionnelle sur cette zone (quotas de 100 000 ormeaux au total en 2015). Cependant, ces fortes mortalités subies de 1998 à 2008 peuvent-elles être suffisantes pour expliquer à elles seules l'émergence de cette capacité de résistance ? En effet, l'isolement géographique de potentiels géniteurs pourrait être également un facteur crucial favorisant le maintien puis la domination d'un seul phénotype résistant au sein de populations naturelles de mollusques. Or, récemment, une étude de génétique des populations a été effectuée sur l'ensemble de la répartition d'*H. tuberculata*. Cette étude, par l'utilisation de marqueurs microsatellites, semble suggérer une forte connectivité entre les populations d'Atlantique nord (Roussel & van Wormhoudt 2016). En effet, l'approche microsatellite, marqueur qui témoigne d'évolution récente, ne montre pas de structuration génétique entre l'ensemble des populations de Bretagne et Normandie. Cependant, Saint-Malo ne fait pas partie des populations analysées dans cette étude. Il serait donc très intéressant d'évaluer la différenciation génétique de cette population avec les autres de Bretagne Nord et

Normandie, afin de déterminer si celle-ci est effectivement isolée génétiquement. La connectivité et la diversité allélique peuvent être analysées grâce à des marqueurs microsatellites. Cependant, une autre technique peut être utilisée pour analyser des différences plus spécifiques à la résistance : l'analyse de « Single Nucleotide Polymorphisms » (SNPs). Ce type d'analyse présente deux avantages : elle peut être réalisée à l'aide des données de séquençage d'ARN déjà obtenues sur les deux populations, et elle peut permettre d'identifier des gènes d'intérêt présentant une signature de sélection à l'aide de la méthode « Fst outlier analysis ». En résumé, cette analyse consiste à détecter les SNPs dans les données brutes de séquençage de chaque espèce. La comparaison de chaque SNP entre les populations permet d'extraire les mutations présentant un écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg et qui sont donc sous sélection. Cette méthode est traditionnellement utilisée sur des données de génomique, mais des méthodes sont développées pour l'adapter à des données de séquences exprimées (De Wit et al. 2015). L'analyse effectuée sur des données RNAseq confère une caractéristique plus fonctionnelle à l'étude, ce qui est adaptée dans le contexte de ce travail.

Une analyse des SNPs, adaptée à des données de séquences exprimées, pourrait permettre d'expliquer la raison de cette meilleure réponse immunitaire de Saint-Malo au niveau génétique. Cependant, une autre hypothèse nécessite d'être approfondie : le compromis énergétique. En effet, concernant les mortalités estivales de l'huître *C. gigas*, plusieurs études ont clairement démontré la corrélation entre l'investissement dans la reproduction et la mortalité estivale (Delaporte et al. 2007; Decker et al. 2011). L'hypothèse selon laquelle la gamétogenèse de Saint-Malo serait régulée différemment que celle de Molène est donc envisageable. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par le suivi des deux populations par des marqueurs énergétiques, comme les réserves en glycogène couplées à l'évolution des paramètres immunitaires durant la gamétogenèse dans leurs milieux respectifs. Une meilleure gestion énergétique durant la gamétogenèse pourrait contribuer, à la fin de l'été, à une plus grande disponibilité énergétique permettant l'expression d'une réponse immunitaire efficace de la part de la population de Saint Malo.

Les branchies, voie d'entrée de la bactérie, ou barrière infranchissable

Un des résultats très importants de ce travail est l'implication des branchies dans la résistance. Deux indices permettent de penser que celle-ci peuvent jouer un rôle. Tout d'abord, dans le chapitre 1, il est démontré que le nombre d'ormeaux de Saint-Malo présentant une quantité détectable de bactéries sur leur branchie est très faible et significativement différent de ce qui est observé chez Molène. Les résultats de transcriptomique donnent potentiellement un élément de réponse quant à cette différence par la surexpression très importante d'un gène chez Saint-Malo : la Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1-B (UDP-GalNAc). Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de mucine. Elle induit des réactions d'O-glycosylation qui est une modification post-traductionnelle. Les mucines sont donc des glycoprotéines dont les carbohydrates représentent entre 70 et 80% de la masse moléculaire (Lamblin et al. 1991; Staudacher 2015). Cette famille de molécules a la particularité de présenter une grande variabilité, aussi bien par leur base peptidique que par la chaîne de carbohydrate qu'elle porte. Ce sont d'ailleurs ces mucines qui servent « d'antigène » au « fibrinogen-like proteins » de *B. glabrata* pour la reconnaissance des différentes souches de *S. mansoni*. Ces molécules représentent par ailleurs le composant principal du mucus et a été impliqué dans de nombreux phénomènes de résistance ou de susceptibilité à des maladies. Tout d'abord, le mucus représente une barrière physique qui doit être franchie par la bactérie, son expression est donc très importante. De plus, ces mucines peuvent servir de point d'ancrage pour les bactéries afin d'adhérer aux muqueuses grâce à la reconnaissance des résidus carbohydrates par des lectines membranaires, ou des adhésines (Linden et al. 2008). La reconnaissance des mucines par les bactéries peuvent provoquer l'induction de facteur de virulence ou de croissance. Cependant, toujours dans un contexte de course à l'armement, il semblerait que l'hôte soit capable d'altérer la glycosilation de ces mucines, changeant de ce fait les carbohydrates reconnus par les bactéries et permettant ainsi d'éviter l'adhésion et/ou l'induction de facteurs de virulence par les bactéries, ou même d'inhiber la virulence (Pan et al. 2013). Chez l'huître, Espinosa et al. (2013) ont démontré que *Perkinsus marinus* montrait une augmentation de son taux de croissance en présence de son hôte *C. gigas* tandis qu'une inhibition de la croissance a été observée avec du mucus d'une huître qui n'est

pas son hôte naturel : *C. virginica*. Cela démontre une spécificité de la capacité de croissance d'un parasite par rapport à la nature du mucus et une possible voie de recherche de facteur de résistance. Au vu des résultats de transcriptomique ainsi que de la quantité de bactéries retrouvées sur les branchies d'ormeaux de Saint-Malo et Molène, il est fort probable que des effecteurs de résistance soient présents au niveau des branchies. Or ce gène : UDP-GalNAc, fait partie des plus sur-exprimés chez Saint-Malo. Il serait donc intéressant de le caractériser et d'observer l'évolution de son expression chez Molène et Saint-Malo pendant une infection et en particulier dans les hémocytes et les branchies. Il serait aussi nécessaire d'évaluer la capacité d'adhésion et de croissance de *V. harveyi* en présence de mucus de chaque population comme cela a été fait pour l'huître et *P. marinus* (Espinosa et al. 2013). Une approche plus globale pourrait aussi être envisagée comme une approche protéomique. De plus, pour chaque ormeau prélevé et analysé en chapitre 1, des échantillons de branchies d'ormeaux ont été prélevés et maintenus à -80°C justement pour ce type d'analyse et sont aujourd'hui disponibles. Ce type d'approche peut aussi être utilisé pour étudier le profil protéique du mucus de l'ormeau comme cela a été fait pour l'huître *C. virginica* dont le mucus a été extrait du manteau, des branchies et des palpes labiaux (Espinosa et al. 2015). Les auteurs ont détecté une quantité importante de PRRs et d'effecteurs de l'immunité dans ces profils protéiques, renforçant l'importance de cette sécrétion dans la défense contre les infections.

L'effet de priming immunitaire chez *Haliotis tuberculata*

Les études antérieures à ce travail ont été effectuées avec des populations d'ormeaux présentant une grande sensibilité à la maladie. Il était donc compliqué de déceler un effet de priming avec une simple exposition. En effet, *V. harveyi* tue assez rapidement les ormeaux sensibles, ne laissant qu'un faible pourcentage d'individus résistants qui peuvent montrer de meilleures capacités lors d'une deuxième infection simplement par effet de sélection des phénotypes sensibles. Disposant d'une population résistante, ce type de réponse a pu être observé durant l'expérience d'infection successive présentée dans le premier chapitre, mais seulement sur la population de Saint-Malo. A la première infection,

celle-ci a subi une inhibition de 40% de sa capacité de phagocytose comparée au témoin au bout de 24 heure d'exposition. Cependant, à la deuxième exposition face à *V. harveyi*, aucune inhibition n'a été observée. Plus intéressant encore, la capacité des ECPs de *V. harveyi* à inhiber la phagocytose de bactéries GFP a été démontrée sur les deux populations non-exposées tandis que les individus de Saint-Malo qui avaient subi les deux expositions deux mois auparavant n'ont pas montré d'inhibition significative. Ces deux résultats suggèrent l'existence d'un priming immunitaire chez l'ormeau, qui plus est sur une période assez longue. Dans la littérature, deux types de priming immunitaire sont différenciés : la réponse soutenue (« sustained response »), qui consiste simplement à garder surexprimé la réponse immunitaire provoquée lors d'une première infection et donc permettre une meilleure réponse lors d'une deuxième. L'autre type de réponse correspond à la réponse « acquise » ou « rappelée » (« recalled response »), qui consiste à observer un retour à la normale du système immunitaire impliqué, mais tout de même une réponse plus rapide et plus intense lors d'une deuxième exposition (Milutinovic & Kurtz 2016). Ce dernier nécessite donc une spécificité de la reconnaissance. Dans le cas de la réponse observée ici, rien ne permet de différencier ces deux réponses. La spécificité de ce priming peut être cependant testée. Plusieurs études menées sur des invertébrés se sont servies de bactéries inactivées à la chaleur pour induire un phénomène de priming immunitaire afin de tester le possible gain de résistance qu'il pourrait induire (Wu et al. 2004; T. Zhang et al. 2014). Cette technique présente l'avantage de pouvoir induire un priming immunitaire chez une population sensible, ici Molène, sans tuer l'animal. Cette expérience consisterait donc à injecter des ormeaux sensibles (Molène) avec des bactéries inactivées à la chaleur issues de la souche virulente d'une part (ORM4) et de la souche non virulente d'autre part (LMG7890) suivie d'une infection expérimentale avec la souche virulente. Les différences de sensibilité des individus traités avec ORM4 et LMG7890, si différence il y a, renseignerait sur la spécificité de la réponse de *H. tuberculata*. Le suivi après traitement et pendant l'infection de certaines réponses immunitaires (ROS, Phagocytose, THC, phénoloxydase), mais aussi de l'expression des gènes mis en évidence au chapitre deux comme la IKB, l'UDP-GalNAc, ou encore les TLR, serait aussi très instructif quant à la différenciation entre réponse soutenue ou rappelée.

L'analyse transcriptomique a aussi permis l'identification d'un gène bien particulier mais qui n'a pas été discuté dans l'article 2 car il n'a pas été surexprimé chez les individus

infectés : une « Fibrinogen-like protein A » (FREP-A). Ce type de molécule a déjà été discuté plusieurs fois dans ce manuscrit. Ce sont des polypeptides de type lectines, membranaires ou excrétés, qui chez *B. glabrata*, sont très diversifiés et se comportent comme des anticorps en se fixant de manière très spécifique aux mucines produites par son parasite *S. mansoni*, facilitant sa reconnaissance et son internalisation par les hémocytes à la manière d'une opsonine (Dheilly et al. 2015; Moné et al. 2010). Cette FREP-A a été retrouvée surexprimée dans les individus de Saint-Malo non contaminés comparés aux individus de Molène non contaminés. Il semblerait donc que ce gène soit surexprimé de manière constitutive chez Saint-Malo comparé à Molène. Il a été démontré que ces FREPs peuvent se lier à des bactéries et ont été associées à la réponse antimicrobienne de plusieurs organismes marins (Zhang et al. 2008; Zhang et al. 2009; Fan et al. 2008). Il est donc possible que cette FREP soit impliquée dans la reconnaissance précoce de la bactérie par Saint-Malo. Cependant, cette molécule reste à caractériser chez *Haliotis tuberculata*. Dans le transcriptome assemblé pour l'analyse transcriptomique, 4 transcrits montrent des homologies significatives avec, pour la valeur maximum, 49,29% d'identité, avec une séquence du concombre de mer *Parastichopus parvimensis* (E-value = $3e-36$). L'analyse PFAM (visant à identifier les domaines protéiques d'une séquence) n'a identifié qu'un seul des deux domaines qui constituent les FREPs découvertes chez *B. glabrata* : le domaine « C-terminal α/γ -fibrinogen ». Le deuxième domaine « N-terminal immunoglobulin superfamily » n'a donc pas été identifié. Cette surexpression d'apparence constitutive n'a été déterminée que sur trois individus. En complément de la caractérisation de cette molécule, il pourrait être intéressant de déterminer son expression basale dans différents tissus, et aussi chez un plus grand nombre d'individus des populations de Molène et Saint-Malo et d'autres populations afin de voir si cette caractéristique est générale à la population de Saint-Malo.

L'épigénétique chez l'ormeau

L'étude de facteur épigénétique n'en est qu'à ces balbutiements chez les mollusques. Et aucune étude n'a été réalisée dans cette discipline concernant l'ensemble du genre *Haliotis*. Pourtant, dans un contexte de réchauffement global, les caractéristiques de ce type

de mécanisme laissent penser que celui-ci pourrait être impliqué dans l'adaptation des animaux qui le possèdent. Cette étude a donc visé à explorer ce mécanisme chez *Haliotis tuberculata* par l'utilisation de la quantité importante de données de séquençage RNAseq par la méthode de CpGo/e. Cette méthode a ses limites : elle ne permet pas d'observer les méthylations immédiates mais permet de visualiser les empreintes que laisse la méthylation au fil des générations, et donc indirectement d'apporter des preuves de son existence. Tout d'abord, la distribution bimodale qu'affichent les valeurs de CpGo/e permet de penser qu'un système de méthylation existe chez Saint-Malo. La distribution de ces valeurs est très similaire à ce qui a été observée chez *C. gigas*, un modèle dont la méthylation ne fait plus de doute (Gavery & Roberts 2010). Cependant, la DNMT3, reconnue pour être responsable de la méthylation *de novo* n'a pas été retrouvée. On retrouve par contre la DNMT1 et la MBD2. Il faut noter que la méthylation est tissu spécifique et dépend aussi du stade de développement. Il n'est pas impossible que la DNMT3 n'est tout simplement pas été exprimée dans les échantillons analysés. Pour s'assurer de sa présence ou de son absence, il faudrait analyser l'expression des gènes de larves dans des stades plus précoces qu'au stade trochophore, qui est le stade le plus précoce ayant fait partie de la présente analyse. Chez *C. gigas*, les variations de pattern de méthylation sont particulièrement fortes entre le stade oocyte et gastrula. Cependant, le seul gastéropode dont la méthylation a été analysée, *B. glabrata*, présente les mêmes caractères, à savoir l'absence de DNMT3 (Fneich et al. 2013). Plusieurs espèces d'insectes présentent un système de méthylation fonctionnel tout en n'ayant pas cette DNMT3 comme *Bombyx mori* et *Mamestra brassicae* (Glastad et al. 2011). La méthylation est donc possible en l'absence de DNMT3 chez certains animaux. Il est donc tentant de penser que parmi les mollusques, les gastéropodes possèdent un système de méthylation particulier et spécifique à cette classe. Il serait intéressant d'étudier la phylogénie des gènes de la DNMT1 et de la MBD2 à partir des séquences protéiques de plusieurs espèces de gastéropodes. Cela permettrait d'observer si cette classe forme un groupe homogène et isolé concernant ces deux gènes, et d'observer où ils se placent dans l'arbre phylogénétique par rapport aux espèces qui possèdent la DNMT3 et celles qui en sont dépourvues.

L'ensemble de ce travail s'est focalisé sur l'étude de deux populations qui vivent dans des milieux dont les facteurs biotiques et abiotiques sont très différents. Par ailleurs, la

population de Saint-Malo a montré une résistance significative à la maladie. Il est fort probable que l'émergence de cette résistance soit due aux pressions de sélections importantes qu'elle a subies. Il n'en reste pas moins que la population de Saint Malo vit dans un milieu plus chaud en été, dans lequel elle doit combattre l'infection par *V. harveyi* mais potentiellement aussi d'autres bactéries. En effet son milieu est plus hostile que celui de Molène, et certaines adaptations s'imposent. L'étude de SNP précédemment proposé viserait à analyser les divergences génétiques de ces deux populations. La présente étude quant à elle, a tenté d'analyser les divergences épigénétiques potentiellement causées par les environnements et les historiques très différents de ces deux populations. A notre connaissance, il n'existe aucune étude ayant comparé des profils de CpGo/e entre deux populations de la même espèce. La méthylation étant provoquée par des facteurs environnementaux, il est possible qu'au fil des générations, des classes de gènes différenciellement méthylés entre les populations modifient ce profil de CpGo/e qui représente les empreintes de ces méthylations. Dans les comparaisons effectuées, la reproduction a montré une différence significative entre ces deux populations. Cette différence apparaît être cohérente. Le déroulement de la gamétogenèse étant finement lié à la température, sa régulation par les ormeaux de Saint-Malo pourrait donc être différente de celle de Molène. En lien avec leur environnement contrasté, il est donc fort probable qu'un compromis énergétique entre reproduction et immunité soit régulé de manière différente chez les ormeaux de Saint-Malo comparés à ceux de Molène. Par, exemple, il a été observé que l'UDP-GalNAc, impliqué dans la synthèse de mucine, composant principal du mucus, était sur-exprimé seulement au sein des populations de Saint Malo comparées à celles de Molène, lors de l'infection. Or, la production de mucus chez les mollusques marins représente une consommation très importante d'énergie (Production & Mucus 1998). De plus, afin de valider la méthylation de l'ADN d'*Haliotis tuberculata*, ainsi que de comparer les profils d'ADN méthylés selon les classes de gènes et entre les deux populations, une méthode de séquençage globale après conversion au bisulfite pourrait être envisagée. La conversion consiste en un traitement de l'ADN par du bisulfure de sodium qui aura pour effet de convertir toutes les cytosines non méthylées en uracile qui seront ensuite remplacés par des thymines lors d'une amplification par PCR. La comparaison des séquences traitées avec des séquences non traitées permet ensuite de localiser précisément chaque 5-méthylcytosine (Gavery & Roberts 2013). Cela permettrait, d'une part de valider la présence

de 5-méthylcytosine et de comparer les profils de méthylation des deux populations en fonction des différentes classes de gènes.

En conclusion, l'ensemble de cette étude a permis de confirmer expérimentalement la capacité de résistance de la population d'ormeaux de Saint Malo à la vibriose. Des avancées considérables ont été réalisées dans le domaine de la réponse immunitaire cellulaire et moléculaire de l'ormeau européen permettant de focaliser de futures recherches sur certaines voies spécifiques. Des facteurs de résistance ont pu être démontrés tels que le priming immunitaire et l'implication d'effecteurs de l'immunité au niveau de la voie d'entrée du pathogène. De plus, ce travail a permis d'ouvrir des perspectives prometteuses sur les processus épigénétiques chez l'ensemble du genre *Haliotis*.

REFERENCES

- Akbari, M. et al., 2007. Different organization of base excision repair of uracil in DNA in nuclei and mitochondria and selective upregulation of mitochondrial uracil-DNA glycosylase after oxidative stress. *Neuroscience*, 145(4), pp.1201–1212. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.010>.
- Allam, B. & Pales Espinosa, E., 2016. Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish and Shellfish Immunology*, 53, pp.4–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.037>.
- Allam, B. & Raftos, D., 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, pp.121–136. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>.
- Altizer, S., Harvell, D. & Friedle, E., 2003. Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(11), pp.589–596.
- Armstrong, P.B., 2006. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology*, 211(4), pp.263–281.
- Austin, B. & Zhang, X.-H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), pp.119–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16869892> [Accessed June 14, 2014].
- Baeuerle, P.A. & Henkel, T., 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual review of immunology*, 12(1), pp.141–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8011280> <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.iy.12.040194.001041>.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), pp.381–395. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3193420&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- Barton, G.M. et al., 2003. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. , 1524(2003), pp.36–38.
- Basuyaux, O., 1997. Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques sur la croissance de l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) en élevage en circuit semi-fermé. , p.237.
- Basuyaux, O. & Labrut, S., 2007. *Suivi halieutique et zoosanitaire des populations d'ormeaux du Nord Cotentin*,
- Bateman, A. et al., 2015. UniProt: A hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), pp.D204–D212.
- Bathige, S.D.N.K. et al., 2016. Three novel C1q domain containing proteins from the disk abalone *Haliotis discus discus*: Genomic organization and analysis of the transcriptional changes in response to bacterial pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*, 56, pp.181–187. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.010>.

- Bathige, S.D.N.K. et al., 2015. Three novel clade B serine protease inhibitors from disk abalone, *Haliotis discus discus*: Molecular perspectives and responses to immune challenges and tissue injury. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), pp.334–341. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.020>.
- Belhsen, O., 2000. *Etude cytologique de la gamétogenèse, du système nerveux central et du cycle de reproduction de l'ormeau européen <i>Haliotis tuberculata</i>*.
- Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), pp.2114–2120.
- Bruchhaus, I. et al., 2007. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends in Parasitology*, 23(8), pp.376–383.
- Cano, C.E. et al., 2009. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Research*, 69(1), pp.219–226.
- Cardinaud, M., 2013. *Etude multifactorielle de la vibriose chez l'ormeau européen Haliotis tuberculata*.
- Cardinaud, M. et al., 2015. The early stages of the immune response of the European abalone *Haliotis tuberculata* to a *Vibrio harveyi* infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 51(2), pp.287–297. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X15000427>.
- Cardinaud, M., Offret, C., et al., 2014. The impacts of handling and air exposure on immune parameters, gene expression, and susceptibility to vibriosis of European abalone *Haliotis tuberculata*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24215911> [Accessed August 19, 2014].
- Cardinaud, M., Barbou, A., et al., 2014. *Vibrio harveyi* adheres to and penetrates tissues of the European abalone *Haliotis tuberculata* within the first hours of contact. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(20), pp.6328–6333. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25107972>.
- Casadevall, A. & Pirofski, L., 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 67(8), pp.3703–3713.
- Chávez-mMrdonez, J. & Gallardo-Escárate, C., 2014. Immune response of apoptosis-related cysteine peptidases from the red abalone *Haliotis rufescens* (HrCas8 and HrCas3): Molecular characterization and transcription expression. *Fish and Shellfish Immunology*, (May), pp.1–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.027>.
- Chen, L. et al., 2012. Functional characterizations of RIG-I to GCRV and viral/bacterial PAMPs in Grass Carp *Ctenopharyngodon idella*. *PLoS ONE*, 7(7).
- Cheng, W. et al., 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(2), pp.157–164. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15276603> [Accessed June 14, 2014].
- Ciacci, C. et al., 2009. Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 153(4), pp.365–371. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393331> [Accessed February 22, 2014].

- Collins, M. et al., 2013. Long-term climate change: projections, commitments and irreversibility. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, pp.1029–1136.
- Colquhoun, D.J. & Sørum, H., 2001. Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*. *Microbial pathogenesis*, 31(5), pp.213–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401001904644>.
- Cong, M. et al., 2008. The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 151(2), pp.191–196.
- Coustau, C. et al., 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), pp.5–16. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.036>.
- Coustau, C. & Théron, A., 2004. Resistant or resisting: seeking consensus terminology. *Trends in Parasitology*, 20(5), pp.208–209. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492204000558>.
- Crane, M.S.J. et al., 2013. Evaluation of abalone Viral Ganglioneuritis resistance among wild abalone populations along the victorian coast of Australia. *Journal of Shellfish Research*, 32(1), pp.67–72. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.2983/035.032.0112>.
- Dang, V.T. et al., 2011. Variation in the antiviral and antibacterial activity of abalone *Haliotis laevis*, *H. rubra* and their hybrid in South Australia. *Aquaculture*, 315(3–4), pp.242–249. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848611001992> [Accessed May 28, 2014].
- Darshanee Ruwandeeepika, H.A. et al., 2015. Expression and quorum sensing regulation of type III secretion system genes of *Vibrio harveyi* during infection of gnotobiotic brine shrimp. *PLoS ONE*, 10(12), pp.1–12.
- Deakin, J.E. et al., 2014. Comparative epigenomics : an emerging field with breakthrough potential to understand evolution of epigenetic regulation. , 1(1), pp.34–54.
- Decker, D. et al., 2011. Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *Invertebrate Pathology*, 106(2), pp.179–191.
- Defoirdt, T. et al., 2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *The ISME journal*, 2(1), pp.19–26.
- Dégremont, L., 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture*, 317(1–4), pp.94–98. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.029>.
- Delaporte, M. et al., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 353(1), pp.45–57.
- Dheilly, N.M. et al., 2015. A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and comparative immunology*, 48(1), pp.234–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25451302> [Accessed

January 13, 2015].

- Dimond, J.L. & Roberts, S.B., 2015. Germline DNA methylation in reef corals : patterns and potential roles in response to environmental change. , pp.1895–1904.
- Doherty, C.P., 2007. Host-pathogen interactions: the role of iron. *The Journal of nutrition*, 137(5), pp.1341–1344.
- Dolashka, P. et al., 2015. Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from helix and rapana snails. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(999), pp.1–1. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&doi=10.2174/138920101666150907113435>.
- Dong, Y., Taylor, H.E. & Dimopoulos, G., 2006. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biology*, 4(7), pp.1137–1146.
- Dridi, S., Romdhane, M.S. & Elcafsi, M., 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*, 263(1–4), pp.238–248.
- Dubief, B. et al., 2017. Immune priming and portal of entry effectors improve response to vibrio infection in a resistant population of the European abalone. *Fish and Shellfish Immunology*, 60, pp.255–264. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.017>.
- Elango, N. & Yi, S. V., 2008. DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters. *Molecular Biology and Evolution*, 25(8), pp.1602–1608.
- Elston, R. & Lockwood, G.S., 1983. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Fish Disease*, 6(2), pp.111–128.
- Espinosa, E.P., Koller, A. & Allam, B., 2015. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of proteomics*, 132, pp.63–76. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391915301913>.
- Espinosa, E.P., Winnicki, S. & Allam, B., 2013. Early host-pathogen interactions in a marine bivalve: *Crassostrea virginica* pallial mucus modulates *Perkinsus marinus* growth and virulence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(3), pp.237–247.
- Fan, C. et al., 2008. Fibrinogen-related protein from amphioxus *Branchiostoma belcheri* is a multivalent pattern recognition receptor with a bacteriolytic activity. *Molecular Immunology*, 45(12), pp.3338–3346.
- Finn, R.D., Clements, J. & Eddy, S.R., 2011. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), pp.29–37.
- Flannagan, R.S., Cosío, G. & Grinstein, S., 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews. Microbiology*, 7(5), pp.355–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369951>.
- Fneich, S. et al., 2013. 5-methyl-cytosine and 5-hydroxy-methyl-cytosine in the genome of *Biomphalaria glabrata* , a snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Parasites & vectors*, 6, p.167. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3681652&tool=pmcentrez&render type=abstract>.

- Ford, S.E. & Bushek, D., 2012. Development of resistance to an introduced marine pathogen by a native host. *Journal of Marine Research*, 70(2–3), pp.205–223. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84866775158&partnerID=40&md5=66470ef5f23f8583425216e5f5e5a28a>.
- Fraga, M.F. & Esteller, M., 2007. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in Genetics*, 23(8), pp.413–418.
- Frey, J. & Origgi, F.C., 2016. Type III secretion system of *Aeromonas salmonicida* undermining the host's immune response. *Frontiers in Marine Science*, 3(July), p.130.
- Friedman, C.S. et al., 2014. Reduced disease in black abalone following mass mortality: phage therapy and natural selection. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAR), pp.1–10.
- Fujita, T., Endo, Y. & Nonaka, M., 2004. Primitive complement system - Recognition and activation. *Molecular Immunology*, 41(2–3), pp.103–111.
- Gaillard, J.M., 1958. *Haliotis tuberculata* Linné. Systématique et distribution. *Bull. Lab. Mar. Dinard*, 44, pp.7–11.
- Gauger, E.J. & Gómez-Chiarri, M., 2002. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 52(1), pp.39–46.
- Gavery, M.R. & Roberts, S.B., 2014. A context dependent role for DNA methylation in bivalves. *Briefings in Functional Genomics*, 13(3), pp.217–222.
- Gavery, M.R. & Roberts, S.B., 2010. DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC genomics*, 11, p.483. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2996979&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- Gavery, M.R. & Roberts, S.B., 2013. Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. *PeerJ*, 1, p.e215. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3840415&tool=pmcentrez&render_type=abstract [Accessed January 20, 2014].
- Geiger, D.L., 1998. Recent genera and species of the family *Haliotidae* Rafinesque, 1815 (Gastropoda: Vetigastropoda). *The Nautilus*, 111(3), pp.85–116.
- Geiger, D.L. & Groves, L.T., 1999. Review of fossil abalone (Gastropoda: Vetigastropoda: Haliotidae) with comparison to recent species. *Journal of Paleontology*, 73(5), pp.872–885.
- Gentleman, R.C. et al., 2004. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5, p.R80. Available at: <http://genomebiology.com/2004/5/10/R80>.
- Glastad, K.M. et al., 2011. DNA methylation in insects : on the brink of the epigenomic era. , 20, pp.553–565.
- Goebel, S., Gross, U. & Lüder, C.G., 2001. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *Journal of cell science*, 114(Pt 19), pp.3495–505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682609>.
- Goedken, M. et al., 2005. Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular

- defense mechanism by *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*, 24(1), pp.487–496.
- Gómez-Díaz, E. et al., 2012. Epigenetics of host–pathogen interactions: the road ahead and the road behind. *PLoS Pathogens*, 8(11), p.e1003007. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003007>.
- Gordy, M.A., Pila, E.A. & Hanington, P.C., 2015. The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), pp.39–49. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.005>.
- Green, T.J., Vergnes, A., et al., 2016. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Veterinary Research*, 47(1), pp.1–11.
- Green, T.J., Helbig, K., et al., 2016. Primed for success: Oyster parents treated with poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Molecular Immunology*, 78, pp.113–120. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.09.002>.
- Green, T.J. & Barnes, A.C., 2009. Inhibitor of REL/NF-KB is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune antioxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(2), pp.260–265.
- Guo, F. et al., 2009. Effects of small abalone, *Haliotis diversicolor*, pedal mucus on bacterial growth, attachment, biofilm formation and community structure. *Aquaculture*, 293(1–2), pp.35–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.033>.
- Gur-Arie, L. & Rosenshine, I., 2015. Subversion of MAPK signaling by pathogenic bacteria. *MAP Kinase*, 4(1). Available at: <http://www.pagepressjournals.org/index.php/mk/article/view/5303>.
- Gutierrez, A. & Sommer, R.J., 2004. Evolution of dnmt-2 and mbd-2-like genes in the free-living nematodes *Pristionchus pacificus*, *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. , 32(21), pp.6388–6396.
- Gutierrez, A. & Sommer, R.J., 2007. Functional diversification of the nematode mbd2/3 gene between *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*. *BMC genetics*, 8, p.57. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2000911&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- Haas, B.J. et al., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols*, 8(8), pp.1494–512. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3875132&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- Harney, E. et al., 2016. De novo assembly and annotation of the European abalone *Haliotis tuberculata* transcriptome. *Marine Genomics*, 28, pp.11–16. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2016.03.002>.
- Harris, T.W. et al., 2014. WormBase 2014 : new views of curated biology. , 42, pp.789–793.
- Harvell, C.D. et al., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296(5576), pp.2158–2162. Available at: <http://ejournals.ebsco.com/direct.asp?ArticleID=B8MRTKLW08DRH8B7A9VM>.
- Hayashi, I., 1983. Seasonal changes in condition factors and in the C/N ration of the foot of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association, U.K.*, 63(December

- 1974), pp.85–95.
- Hayashi, I., 1980. The reproductive biology of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 60(2), pp.415–430.
- Henke, J. & Bassler, B., 2004. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 186(12), pp.3794–3805. Available at: <http://jb.asm.org/content/186/12/3794.short>.
- Hernández López, J. et al., 2014. Trans-generational immune priming in honeybees. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 281(1785), p.20140454. Available at: <http://rsps.royalsocietypublishing.org/content/281/1785/20140454>.
- Huang, C.Y., Liu, P.C. & Lee, K.K., 2001. Withering syndrome of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and associated with thermal induction. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 56(9–10), pp.898–901.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2008. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), pp.44–57. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2008.211>.
- Huang, J. et al., 2006. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*, 444(7119), pp.629–632.
- Huchette, S. & Clavier, J., 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *Journal of Shellfish Research*, 23(4), pp.951–955.
- Ichiyama, K. et al., 2015. The methylcytosine dioxygenase Tet2 promotes DNA demethylation and activation of cytokine gene expression in T cells article. *Immunity*, 42(4), pp.613–626. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.005>.
- Jabbari, K. & Bernardi, G., 2004. Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. , 333, pp.143–149.
- Jair, K.W., 2006. De novo CpG Island Methylation in Human Cancer Cells. *Cancer Research*, 66(2), pp.682–692. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-1980>5Cnpapers2://publication/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-1980.
- Jiang, Y.S. & Wu, X.Z., 2007. Characterization of a Rel/NF- κ B homologue in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 31(2), pp.121–131.
- Kaimuddin, A.H., Laë, R. & Tito De Morais, L., 2016. Fish Species in a Changing World: The Route and Timing of Species Migration between Tropical and Temperate Ecosystems in Eastern Atlantic. *Frontiers in Marine Science*, 3(September). Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2016.00162>.
- Kaizu, A. et al., 2011. Functional analysis of C-type lysozyme in penaeid shrimp. *Journal of Biological Chemistry*, 286(52), pp.44344–44349.
- Kim, Y.S. & Ho, S.B., 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), pp.319–330.
- Kimes, N.E. et al., 2011. Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *The ISME Journal*, 6(10), pp.835–846. Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.154>.
- Koch, E.J. et al., 2014. Features governing symbiont persistence in the squid-vibrio association. *Molecular Ecology*, 23(6), pp.1624–1634.
- Kreuz, S. et al., 2004. NF- κ B activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *Journal of Cell Biology*, 166(3), pp.369–380.
- Kucharski, R. et al., 2013. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. , 1827(2008).
- Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology*, 26(4), pp.186–192.
- Kurtz, J. & Franz, K., 2003. Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425(6953), pp.37–38.
- Labreuche, Y. et al., 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5), pp.753–758. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624467> [Accessed January 22, 2014].
- Lamblin, G. et al., 1991. Diversité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques humaines et défense antimicrobienne de la muqueuse bronchique. , 1.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Meth*, 9(4), pp.357–359. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Law, J.A. & Jacobsen, S.E., 2010. Establishing , maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Rev. Genet.*, 11, pp.204–220. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2719>.
- Lee, K.K. et al., 2001. The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *Journal of Thermal Biology*, 26(6), pp.585–587.
- Lee, S.-M. et al., 2012. Stimulation of FasL induces production of proinflammatory mediators through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in THP-1 cells. *Inflammation*, 35(1), pp.1–10.
- Legrand, E. et al., 2016. Transcriptome analysis of the copepod *Eurytemora affinis* upon exposure to endocrine disruptor pesticides: Focus on reproduction and development. *Aquatic Toxicology*, 176, pp.64–75. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.010>.
- Li-byarlay, H. et al., 2013. RNA interference knockdown of DNA methyl- transferase 3 affects gene alternative splicing in the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Li, Y. et al., 2013. Immune Responsive Gene 1 (IRG1) promotes endotoxin tolerance by increasing A20 expression in macrophages through reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), pp.16225–16234.
- Liang, B. et al., 2016. Genetic variation in vibrio resistance in the clam *Meretrix petechialis* under the challenge of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 468, pp.458–463. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.037>.

- Lin, M. & Rikihisa, Y., 2004. *Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU. 1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF- κ B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes. *Cellular Microbiology*, 6(2), pp.175–186.
- Linden, S.K. et al., 2008. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal immunology*, 1(3), pp.183–197.
- von Linné, C., 1766. *Systema naturae per regna tria naturae secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis; editio duodecima.-Holmiae, Salvius 1766-1768*, Salvius.
- Liu, H., Xiang, L. & Shao, J., 2014. A novel C1q-domain-containing (C1qDC) protein from *Mytilus coruscus* with the transcriptional analysis against marine pathogens and heavy metals. *Developmental & Comparative Immunology*, 44(1), pp.70–75. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.11.009>.
- Liu, P. V, 1957. Survey of hemolysin production among species of *pseudomonas*. *Infection and Immunity*, pp.718–727.
- Liu, P.C., Chen, Y.C. & Lee, K.K., 2000. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* . *Microbios*, 104(408), pp.71–77.
- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), p.550. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Madec, S. et al., 2014. Characterization of the secretomes of two vibrios pathogenic to mollusks. *PLoS ONE*, 9(11).
- Maechler, M. et al., 2015. cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions.
- Malek, S. et al., 2001. I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), pp.45225–45235.
- Manduzio, H. et al., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *SciencesNew York*, 2, pp.91–104. Available at: <http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ102.pdf>.
- Matsuo, K. et al., 1993. Evidence for erosion of mouse CpG islands during mammalian evolution. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 19(6), pp.543–555.
- McDowell, I.C. et al., 2014. Transcriptome of American oysters, *Crassostrea virginica*, in response to bacterial challenge: Insights into potential mechanisms of disease resistance. *PLoS One*, 9(8).
- Mersni-Achour, R. et al., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *Journal of Invertebrate Pathology*, 123, pp.49–59. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.09.006>.
- Milutinovic, B. & Kurtz, J., 2016. Immune memory in invertebrates. *Seminars in Immunology*, 28(4), pp.328–342.
- Mitta, G. et al., 2012. Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. *Developmental and Comparative Immunology*, 37(1), pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.09.002>.

- Monari, M. et al., 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(1), pp.98–114.
- Moné, Y. et al., 2010. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9).
- Montagnani, C. et al., 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS letters*, 561(1–3), pp.75–82.
- Moreira, R. et al., 2012. Transcriptomics of in Vitro immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 7(4).
- Moret, Y., 2006. Trans-generational immune priming: specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273(1592), pp.1399–405. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1560290&tool=pmcentrez&render_type=abstract [Accessed February 24, 2014].
- Munroe, D.M. et al., 2015. Outcomes of asymmetric selection pressure and larval dispersal on evolution of disease resistance: a metapopulation modeling study with oysters. *Marine Ecology Progress Series*, 531, pp.221–239.
- Nam, B.H. et al., 2016. Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in *Haliothis discus hannai* innate immunity during *Vibrio parahaemolyticus* infection. *PLoS ONE*, 11(4), pp.1–16.
- Nanty, L. et al., 2011. Comparative methylomics reveals gene-body H3K36me3 in *Drosophila* predicts DNA methylation and CpG landscapes in other invertebrates. , pp.1841–1850.
- Narayanan, L.A. & Edelmann, M.J., 2014. Ubiquitination as an efficient molecular strategy employed in *Salmonella* infection. *Frontiers in Immunology*, 5(NOV), pp.1–7.
- Nicolas, J.L. et al., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliothis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50(1), pp.35–43.
- Nishimori, E. et al., 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supertexta*. *Fish Pathology*, 33(5), pp.495–502.
- Norouzitallab, P. et al., 2016. Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. *Scientific Reports*, 6, p.21166. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4753410&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- Okamura, S. et al., 2001. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Molecular Cell*, 8(1), pp.85–94.
- Okano, M. et al., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99, pp.247–257.
- Olivares-Fuster, O. et al., 2011. Adhesion dynamics of *Flavobacterium columnare* to channel catfish *Ictalurus punctatus* and zebrafish *Danio rerio* after immersion challenge. *Diseases of Aquatic Organisms*, 96(3), pp.221–227.

- Oliveros, J.C., 2007. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. 2007. Available at: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Olson, C.E. & Roberts, S.B., 2014. Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in *Crassostrea gigas* male gametes. , 5(June), pp.1–7.
- Orth, K. et al., 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase superfamily by a yersinia effector. *Science*, 285(September), pp.1920–1923.
- Pacchierotti, F. & Spanò, M., 2015. Environmental Impact on DNA Methylation in the Germline: State of the Art and Gaps of Knowledge. *BioMed Research International*, 2015, p.123484. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4538313&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- Paillard, C. et al., 1999. Temperature effects on brown ring disease susceptibility and defense-related activities in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *J Shellfish Res*, 18, p.298.
- Paillard, C., Le Roux, F. & Borrego, J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, 17(4), pp.477–498.
- Pan, Q. et al., 2013. Enhanced membrane-tethered mucin 3 (MUC3) expression by a tetrameric branched peptide with a conserved tflk motif inhibits bacteria adherence. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), pp.5407–5416.
- Pichon, D., Cudennec, B. & Huchette, S., 2013. Characterization of abalone *Haliotis tuberculata*–*Vibrio harveyi* interactions in gill primary cultures. *Cytotechnology*, pp.759–772. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10616-013-9583-1> [Accessed January 15, 2015].
- Pinaud, S. et al., 2016. A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathogens*, 12(1), pp.1–18.
- Portela, J. et al., 2013. Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. *Journal of Innate Immunity*, 5(3), pp.261–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343530> [Accessed January 13, 2015].
- Production, M. & Mucus, F., 1998. *Mucus from Marine Molluscs*,
- R Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- Rafinesque, C.S., 1815. *Analyse de la nature, ou tableau de l'univers et des corps organisés*, 1815 aux d{é}pens de l'auteur.
- Ramagli, L.S., 1999. 2-D proteome analysis protocols. In A. J. Link, ed. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 99–103. Available at: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-584-7:99>.
- Rauta, P.R. et al., 2014. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. *Immunology Letters*, 158(1–2), pp.14–24. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.013>.
- Raymond, B. et al., 2013. Subversion of trafficking, apoptosis, and innate immunity by type III secretion system effectors. *Trends in Microbiology*, 21(8), pp.430–441. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.06.008>.
- Reik, W., 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447(7143), pp.425–432. Available at:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17522676.
- Richard, G. et al., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* - Part II: Combined effect of temperature and two *V. tapetis* strains. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(1), pp.79–87.
- Rius, J. et al., 2008. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature*, 453(7196), pp.807–811. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2669289&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- Riviere, G. et al., 2013. DNA methylation is crucial for the early development in the Oyster *C. gigas*. *Marine biotechnology (New York, N. Y.)*, 15(6), pp.739–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877618> [Accessed February 12, 2014].
- Rivière, G., Staaden, M. Van & Green, B., 2014. Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates. *Frontiers in Physiology*, 5(April), pp.1–7.
- Romero, A., Novoa, B. & Figueras, A., 2015. The complexity of apoptotic cell death in mollusks : An update. *Fish and Shellfish Immunology*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.038>.
- Roussel, V. & van Wormhoudt, A., 2016. The Effect of Pleistocene Climate Fluctuations on Distribution of European Abalone (*Haliotis tuberculata*), Revealed by Combined Mitochondrial and Nuclear Marker Analyses. *Biochemical Genetics*, pp.1–31.
- Le Roux, F. et al., 2015. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: Ecology, evolution and pathogenesis (Paris, 11-12 March 2015). *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), pp.1–8.
- Rowley, A.F. & Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology*, 179(11), pp.7209–7214. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/179/11/7209.full>.
- Royet, J., 2004. Infectious non-self recognition in invertebrates : lessons from *Drosophila* and other insect models. *Molecular Immunology*, 41, pp.1063–1075.
- Sack, D.A. et al., 2004. Cholera. *The lancet*, 363, p.223.
- Saranya Revathy, K. et al., 2012. First molluscan theta-class Glutathione S-Transferase: Identification, cloning, characterization and transcriptional analysis post immune challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 162(1–3), pp.10–23. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.02.004>.
- Sawabe, T. et al., 2003. Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: A possible role for establishment of abalone-*V. halioticoli* association. *Aquaculture*, 219(1–4), pp.671–679.
- Sawabe, T. et al., 2007. Mass mortalities of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes and Environment*, 22(3), pp.300–308.
- Schikorski, D. et al., 2013. Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. , 395, pp.106–112.

- Schorderet, D.F. & Gartler, S.M., 1992. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(3), pp.957–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48364&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sengenès, J., 2012. *Développement de méthodes de séquençage de seconde génération pour l'analyse des profils de méthylation de l'ADN*. Université Paris VI.
- Seo, J.-K. et al., 2016. Antimicrobial peptide, hdMolluscidin, purified from the gill of the abalone, *Haliotis discus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 52, pp.289–297. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464816301255>.
- Shanshan, L. et al., 2015. Changes in global DNA methylation intensity and DNMT1 transcription during the aging process of scallop *Chlamys farreri*. , 14(4), pp.685–690.
- Shukla, S. et al., 2011. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNAmethylation to splicing. *Nature*, 479(7371), pp.74–79. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10442>.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, a & Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 5(5), pp.415–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256882>.
- Simpson, V.J., Johnson, T.E. & Hammen, R.F., 1986. Caenorhabditis elegans DNA does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging. *Nucleic Acids Research*, 14(16), pp.6711–6720.
- Sokolova, I., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal*, 6(December), pp.49–58.
- Soto-Rodriguez, S.A. et al., 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53(3), pp.231–240.
- Staroscik, A.M. & Nelson, D.R., 2008. The influence of salmon surface mucus on the growth of *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Diseases*, 31(1), pp.59–69.
- Staudacher, E., 2015. Mucin-Type O-Glycosylation in Invertebrates. *Molecules*, 20(6), pp.10622–10640. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/6/10622/>.
- Steiner, H., 2004. Peptidoglycan recognition proteins: On and off switches for innate immunity. *Immunological Reviews*, 198, pp.83–96.
- Sun, Y. et al., 2016. Characterization of three mitogen-activated protein kinases (MAPK) genes reveals involvement of ERK and JNK, not p38 in defense against bacterial infection in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, pp.507–515. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.139>.
- Suzuki, M.M. et al., 2007. CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Research*, 17(5), pp.625–631.
- Takeda, K. & Akira, S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), pp.1–14.
- Taus, C. et al., 2013. Expression and characterization of the first snail-derived UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Glycoconjugate Journal*, 30(9),

- pp.825–33. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3825155&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Teaniniuraitemoana, V. et al., 2014. Gonad transcriptome analysis of pearl oyster *Pinctada margaritifera*: identification of potential sex differentiation and sex determining genes. *BMC Genomics*, 15(1), p.491. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942841>.
- Terahara, K. & Takahashi, K.G., 2008. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Current Pharmaceutical Design*, 14(2), pp.131–7. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220825>.
- Thébault, A., 1998. *Bilan 1998 du Réseau REPAMO*,
- Therneau, T.M., 2015. A Package for Survival Analysis in S. Available at: <http://cran.r-project.org/package=survival>.
- Tincu, J. & Taylor, S., 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), pp.3645–3654.
- Tobback, E. et al., 2010. In vitro markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*, 33(3), pp.197–209.
- Toubiana, M. et al., 2013. Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: Complete cds and gene expression levels. *Developmental and Comparative Immunology*, 40(2), pp.158–166.
- Travers, M., 2008. *Interaction de la bactérie Vibrio harveyi avec son hôte, l'ormeau Haliotis tuberculata : approches physiologiques, cellulaires et moléculaires*.
- Travers, M.-A. et al., 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, pp.11–31. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201115001354>.
- Travers, M.-A., Barbou, A., et al., 2008. Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS microbiology Letters*, 289(1), pp.34–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054091> [Accessed March 4, 2015].
- Travers, M.-A. et al., 2010. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2010), pp.289–297. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201110001734> [Accessed January 15, 2015].
- Travers, M.-A., Basuyaux, O., et al., 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi* : an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology*, 15(6), pp.1365–1376. Available at:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2486.2008.01764.x> [Accessed February 24, 2014].
- Travers, M.-A., Bouffant, R. Le, et al., 2009. Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(1), pp.152–160. Available at:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.21990/full> [Accessed January 15, 2015].
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., et al., 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish and*

- Shellfish Immunology*, 25(6), pp.800–808. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Fish+&+Shellfish+Immunology#2> [Accessed February 13, 2014].
- Travers, M.A. et al., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(4), pp.400–411.
- Van Valen, L., 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary theory*, 1, pp.1–30.
- Vezzulli, L. et al., 2012. Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *The ISME Journal*, 6(1), pp.21–30.
- Waddington, C.H., 1942. The epigenotype. *Endeavour*, (1), pp.18–20.
- Wang, M. et al., 2015. The broad pattern recognition spectrum of the Toll-like receptor in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Developmental and Comparative Immunology*, 52(2), pp.192–201. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.011>.
- Wang, W. et al., 2016. A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 65, pp.182–190. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.010>.
- Wilfert, L. & Jiggins, F.M., 2010. The dynamics of reciprocal selective sweeps of host resistance and a parasite counter-adaptation in drosophila. *Biology Letters*, 6(5), pp.666–8. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2936165&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- De Wit, P. & Palumbi, S.R., 2013. Transcriptome-wide polymorphisms of red abalone (*Haliotis rufescens*) reveal patterns of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology*, 22(11), pp.2884–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23106543> [Accessed February 21, 2014].
- De Wit, P., Pespeni, M.H. & Palumbi, S.R., 2015. SNP genotyping and population genomics from expressed sequences - Current advances and future possibilities. *Molecular Ecology*, 24(10), pp.2310–2323.
- Wittebole, X., Castanares-Zapatero, D. & Laterre, P.F., 2010. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators of Inflammation*, 2010.
- Van Wormhoudt, A. et al., 2011. Mitochondrial DNA Introgression in the European abalone *Haliotis tuberculata tuberculata*: evidence for experimental mtDNA paternal inheritance and a natural hybrid sequence. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 13(3), pp.563–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938796> [Accessed June 16, 2014].
- Wu, G. et al., 2004. Priming Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae With Heat-Killed Bacterial Cells Induced an Enhanced Immune Protection Against Photobacterium luminescens TT01 and the Role of Innate Immunity in the Process. *Entomological Society of America*, (2009), pp.2–5.
- Wu, G. et al., 2015. The specificity of immune priming in silkworm, *Bombyx mori*, is mediated by the phagocytic ability of granular cells. *Journal of Insect Physiology*, 81, pp.60–68. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.004>.
- Ye, J. et al., 2006. WEGO: A web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), pp.293–297.

- Young, D.S. et al., 2007. The mixtools Package Version 0.2. 0: Tools for Mixture Models. *R Package Version 0.2*.
- Yu, Y. et al., 2013. Cytosine Methylation Alteration in Natural Populations of *Leymus chinensis* Induced by Multiple Abiotic Stresses. *PLoS ONE*, 8(2), pp.1–10.
- Zaidman-Rémy, A. et al., 2006. The drosophila amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24(4), pp.463–473.
- Zhang, H. et al., 2009. A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as pattern recognition receptor. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(1), pp.56–64. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.019>.
- Zhang, L. et al., 2014. Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Marine Biotechnology*, 16(1), pp.17–33.
- Zhang, S.-M., Zeng, Y. & Loker, E.S., 2008. Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*. *Innate immunity*, 14(3), pp.175–89. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3638879&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Zhang, S.M., Loker, E.S. & Sullivan, J.T., 2016. Pathogen-associated molecular patterns activate expression of genes involved in cell proliferation, immunity and detoxification in the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and Comparative Immunology*, 56, pp.25–36. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.11.008>.
- Zhang, T. et al., 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 45(1), pp.141–150. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.015>.
- Zhang, X. et al., 2014. Identification and expression analysis of immune-related genes linked to Rel/NF-κB signaling pathway under stresses and bacterial challenge from the small abalone *Haliotis diversicolor*. *Fish and Shellfish Immunology*, 41(2), pp.200–208.
- Zhang, X.H. & Austin, B., 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23(2), pp.93–102.
- Zhao, Y. et al., 2013. Molecular cloning and expression-profile analysis of sea cucumber DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 and methyl-CpG binding domain type 2/3 genes during aestivation. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 165(1), pp.26–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466393> [Accessed February 12, 2014].
- Zhao, Z. et al., 2013. Next-generation sequencing-based transcriptome analysis of *Helicoverpa armigera* larvae immune-primed with *Photobacterium luminescens* TT01. *PLoS One*, 8(11), p.e80146. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3841171&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed January 13, 2015].
- Zhong, Y. et al., 2006. Overexpression, purification, characterization, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* hemolysin VHH. *Infection and Immunity*, 74(10), pp.6001–6005.

- De Zoysa, M. et al., 2009. A novel Fas ligand in mollusk abalone: Molecular characterization, immune responses and biological activity of the recombinant protein. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(3), pp.423–432. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.019>.
- De Zoysa, M. et al., 2010. Molecular evidence for the existence of lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) and Rel/NF- κ B pathways in disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 28(5–6), pp.754–763.

Titre de thèse :

Variabilité de la capacité de résistance des populations de l'ormeau européen
Haliotis tuberculata face à *Vibrio harveyi*

Résumé :

L'augmentation de température que subit la planète ces dernières décennies a de nombreuses conséquences dont la recrudescence de maladies infectieuses aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Certaines populations de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*, vivant dans les zones les plus chaudes de Bretagne et de Normandie ont ainsi subi de très importantes mortalités depuis 1997, dues à la bactérie *Vibrio harveyi*. Cependant, certaines des populations les plus sévèrement touchées se sont aujourd'hui reconstruites et les mortalités semblent s'être arrêtées dans certaines de ces zones. La question se pose donc de l'apparition d'une résistance de l'ormeau face à cette maladie émergente. Pour répondre à cette question, les réponses à l'infection de plusieurs populations naturelles par cette bactérie ont été analysées. Une population présentant une forte résistance à la maladie a été identifiée. La voie d'entrée de la bactérie (ie. les branchies) a été identifiée comme jouant un rôle dans la résistance à l'infection. Par ailleurs, des infections successives ont permis de démontrer un effet d'amorçage immunitaire. Suite à une première exposition, une protection durant jusqu'à deux mois intervient contre l'effet d'inhibition de la phagocytose, provoquée normalement par une infection à *V. harveyi*. La différence d'expression de gènes des hémocytes d'ormeaux sensibles et résistants a été quantifiée par RNAseq pendant une infection expérimentale. Cette comparaison a montré une reconnaissance plus efficace du pathogène chez les résistants, par des récepteurs tels que les TLR ou les PGRP. La forte surexpression chez la population résistante, d'un gène impliqué dans la synthèse de mucine qui est l'un des composants principaux du mucus renforce l'hypothèse d'une forte implication des branchies dans la résistance. Enfin, une analyse *in silico* des séquences obtenues en RNAseq a permis d'apporter des preuves de l'existence d'un système de méthylation de l'ADN chez *H. tuberculata* ainsi qu'une possible implication de ce système dans l'adaptation de l'ormeau à son milieu.

Mots clés : Ormeau, *Haliotis tuberculata*, bactéries, *Vibrio harveyi*, résistance, immunité, hémocytes, transcriptomique, épigénétique, méthylation, branchies, priming.

Thesis title:

Variability in resistance among populations of the European abalone *Haliotis tuberculata* against *Vibrio harveyi*.

Abstract:

Increasing global temperatures have numerous consequences for marine ecosystems, including the rise of infectious diseases. Certain populations of the European abalone *Haliotis tuberculata* have suffered from severe and recurrent mortality since 1997 due to infection caused by the bacterium *Vibrio harveyi*, particularly in areas with higher average summer temperatures. Given the spatial heterogeneity in mortalities, and the observation that the historically most severely impacted populations have recovered in recent years, the question of the emergence of resistance to the disease was addressed. The mortality rate in response to infection by *V. harveyi* was quantified experimentally in abalone originating from three natural populations, and one population exhibiting resistance to the disease was identified. In a subsequent experiment, the immune response of abalone was compared between infected individuals from a resistant and from a susceptible population. The portal of entry of the bacterium (ie. gills) was identified as playing a role in resistance. Furthermore, successive exposures of abalone to the bacterium demonstrated an immune priming effect, such that following a first exposure, phagocytosis was no longer inhibited by infection with *V. harveyi*, and that this improved protection against the disease lasted for at least two months. Differences in gene expression was quantified by RNAseq in the hemocytes of resistant and susceptible abalone following exposure to the pathogen. This comparison showed that resistant abalone had more effective recognition of the bacterium by receptors as the TLR or PGRP. The substantial over-expression of a gene involved in the synthesis of mucin, the main component of mucus, (UDP-GalNAC) in the resistant population, supports the interpretation of a strong involvement of gills in the resistance. Finally, an in-silico analysis of the sequences obtained from RNAseq indicate the existence of a DNA methylation system in *H. tuberculata* and suggested an involvement of epigenetic mechanisms in the adaptation of abalone to its environment.

Key words : Abalone, *Haliotis tuberculata*, bacterium, *Vibrio harveyi*, resistance, immunity, hemocytes, transcriptomic, épigénétique, methylation, gills, priming.