

Pseudoalteromonas sp. NC201, un probiotique isolé en Nouvelle-Calédonie pour l'élevage de la crevette Litopenaeus stylirostris : Caractérisation et impact sur l'état physiologique de la crevette

Louis Sorieul

▶ **To cite this version:**

Louis Sorieul. Pseudoalteromonas sp. NC201, un probiotique isolé en Nouvelle-Calédonie pour l'élevage de la crevette Litopenaeus stylirostris : Caractérisation et impact sur l'état physiologique de la crevette. Interactions entre organismes. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2017. Français. NNT : 2017NCAL0009 . tel-02934098

HAL Id: tel-02934098
https://unc.hal.science/tel-02934098

Submitted on 9 Sep 2020

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.

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

L'école doctorale du Pacifique
(ED469)

Spécialité : **Microbiologie**
Biologie Marine

Louis SORIEUL

Le 28 novembre 2017

Pseudoalteromonas sp. NC201, un probiotique isolé en Nouvelle-Calédonie pour l'élevage de la crevette *Litopenaeus stylirostris* : Caractérisation et impact sur l'état physiologique de la crevette

Travail réalisé au LEAD/NC, IFREMER et au LIVE, UNC

Devant le jury composé de :

Christine PAILLARD	Directeur de recherche, CNRS Brest	Rapporteur
Pascal FAVREL	Professeur, Université de Caen	Rapporteur
Claude PAYRI	Directeur de recherche, IRD Nouméa	Examinateur
Mariko MATSUI	Cadre de recherche, IPNC	Examinateur
Linda GUENTAS	Maître de conférence, UNC	Examinateur
Jörn KALINOWSKI	Professeur, Université de Bielefeld	Examinateur
Viviane BOULO	Cadre de recherche, Ifremer	Directrice
Hamid AMIR	Professeur, UNC	Co-directeur

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont été impliquées de près ou de loin dans l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie Madame Christine Paillard et Monsieur Pascal Favrel pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Mesdames Claude Payri, Mariko Matsui et Linda Guentas ainsi que Monsieur Jörn Kalinowski pour avoir accepté d'être membres du jury de thèse.

Je remercie également le professeur Hamid Amir ainsi que Monsieur André Carpentier pour m'avoir simultanément accueilli au sein du Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE) de l'Université de Nouvelle-Calédonie et de l'unité de recherche Lagons, Écosystèmes et Aquaculture Durable (LEAD) de la délégation IFREMER en Nouvelle-Calédonie.
Je tiens particulièrement à remercier ma directrice de thèse, Viviane Boulo, pour sa disponibilité et sa rigueur scientifique ainsi que mes co-encadrants de thèse, Nelly Wabete et Dominique Pham. Merci pour vos conseils et le partage de vos connaissances dans vos domaines respectifs, sans vous ce travail transversal de thèse n'aurait pas été possible.

Merci également à mon co-directeur de thèse, Hamid Amir, pour sa disponibilité et son soutien.

Merci aux membres des équipes qui m'ont soutenu. Coté Ifremer, je remercie l'équipe PIE, Viviane, Domi et Cécile pour l'aide fournie lors des infections expérimentales et des analyses biomoléculaires. Merci à l'équipe EcoPhy, Nelly, Marie-Mad et Marie, pour l'aide fournie lors des dissections et des analyses biochimiques. Merci à l'équipe ZooTech, Tathan, JR et Matéheau pour les crevettes et l'aide à la mise en place des expérimentations animales.

Merci à l'équipe du LIVE de l'UNC, en particulier Valérie Médevielle et Cyril Antheaume, pour l'aide matérielle et technique tout au cours de ces trois dernières années.

Ich danke vielmals den Kollegen vom CeBiTec, mit euch arbeiten gehörte zu den besten Momente meiner Doktorarbeit und ich hoffe wir werden auch später kollaborieren können.

Je remercie tout le personnel, Ifremer et CTA, de la Station Aquacole de Saint Vincent. Vous avez été des collègues « chocs ».

Merci aux thésards et ex-thésards de l'UNC, Charlotte, Thomas, Laurent, Simon, Alex, Left et Ben pour de m'avoir rappelé lors de mes passages qu'on était plusieurs dans le même bateau.

Un grand merci à ceux qui m'auront fait découvrir la Calédonie et permis de décompresser. Flav, JP et toute la bande merci pour les coups de chasse, de pêche et de fête.

Je tiens à remercier ma famille pour leur soutien et leur compréhension, cela fait trop d'années que je suis loin.

Terima kasih Sayang, saya telah terlalu jauh terlalu panjang. Akhirnya selesai, saya tidak sabar untuk kembali kepada anda. Sayang kamu.

Table des matières

Introduction 5

Chapitre I : Rappels bibliographiques 7

1. Probiotique 9
   1.1. Définition 9
   1.2. Modes d'action des probiotiques 9
      1.2.1. Compétition avec la flore néfaste et/ou stabilisation de la flore bénéfique 9
      1.2.2. Atténuation de virulence des pathogènes 10
      1.2.3. Stimulation du système immunitaire 11
      1.2.4. Amélioration de la nutrition 11
      1.2.5. Amélioration de la qualité de l'eau 12
   1.3. Application en crevetticulture 12
      1.3.1. Historique 12
      1.3.2. Utilisation de probiotiques d'origine terrestre 13
      1.3.3. Utilisation de probiotiques issus d'animaux sains 14
      1.3.4. Utilisation de probiotique environnementaux 14
   1.4. La crevetticulture en Nouvelle-Calédonie 15
      1.4.1. Pathologies en grossissement 15
      1.4.2. Utilisation de probiotiques en Nouvelle-Calédonie 17
      1.4.3. La souche NC201 : un probiotique potentiel 17
2. Le genre Pseudoalteromonas 18
   2.1. Caractéristiques générales 18
      2.1.1. Classification, morphologie et propriétés métaboliques 18
      2.1.2. Etat de la phylogénie : émergence de 2 sous-genres 18
      2.1.3. Un symbiote récurrent 19
   2.2. Activité antimicrobienne 19
      2.2.1. Alcaloïdes 20
      2.2.2. Polykétides 20
      2.2.3. Peptides antimicrobiens 20
   2.3. Espèces de *Pseudoalteromonas* pathogènes pour les élevages marins 21
3. La crevette bleue, Litopenaeus stylirostris 21
   3.1. Taxonomie 21
   3.2. Cycle biologique 22
   3.3. Osmorégulation 24
   3.4. Défense immunitaire chez les crevettes pénéides 25
      3.4.1. Reconnaissance du non-soi 26

3.4.2. Réponse cellulaire 27
3.4.3. Réponse humorale 27
3.5. Stress oxydant 29
Chapitre II : Résultats 33
Partie 1 : La souche NC201, un probiotique potentiel pour les élevages de crevette : séquençage du génome et identification de molécules antimicrobiennes 35
Publication 1 : « Whole genome sequence of *Pseudoalteromonas sp*. NC201, a probiotic strain for *Litopenaeus stylirostris* hatcheries in New Caledonia ». 37
Publication 2 : « Characterization and antibacterial activity, *via* a LodA-like protein, of the *Pseudoalteromonas* strain NC201 as a potential probiotic in shrimp hatchery in New Caledonia ». 40
Partie 2 : Administration de NC201 chez *L. stylirostris* : effet probiotique sur la physiologie de la crevette suite à des stress biotique et abiotique 66
Partie 2.1 : Impact de NC201 sur les paramètres physiologiques globaux de *L. stylirostris* lors de stress infectieux et salins 67
Publication 3 : « Survival improvement by the *Pseudoalteromonas sp.* NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress » 69
Partie 2.2 : Impact de NC201 lors d'un stress infectieux à *Vibrio nigripulchritudo* sur la réponse immunitaire et antioxydante de *L. stylirostris* 94
Publication 4 : « Immune response of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* treated with probiotic *Pseudoalteromonas sp*. NC201 following infection with Vibrio nigripulchritudo » 96
Résultats supplémentaires : L'administration de probiotique NC201 impacte les biomarqueurs impliqués dans la réponse au stress oxydant chez la crevette, *Litopenaeus stylirostris*, impact amplifié par *Vibrio nigripulchritudo* 125
Introduction 125
Matériels et méthodes 125
Résultats/Discussion 128
Chapitre III : Conclusion générale et perspectives 140
Références bibliographiques 155
Résumé / Summary 174

Introduction

L'aquaculture qui en 1995 avoisinait le 20 millions de tonnes de production annuelle s'est hissée en 2014 à 70 millions de tonnes. Elle représente aujourd'hui plus de 45% de la production halieutique, et continue de croître. Dans ce contexte la crevetticulture, qui ne représentait que 0.5Mt par an en 1995, dépasse aujourd'hui les 5Mt (FAO, 2016; Gillett, 2008). Cependant, la croissance effrénée de l'activité crevetticole et l'intensification des pratiques ont conduit, par manque notamment de maîtrise des risques sanitaires, à l'apparition de maladies virales et bactériennes qui sont actuellement l'obstacle principal à son développement (Briggs et al., 2004; FAO, 2016).

En ce qui concerne la production de crevettes en Nouvelle-Calédonie, elle a été amorcée dans les années 1970 par l'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer). Plusieurs essais d'élevages réalisés avec différentes espèces, locales et importées, ont conduit au choix de la crevette bleue du Pacifique, *Litopenaeus stylirostris*, originaire de la côte Pacifique du Mexique. Cette espèce présente en effet de bonnes performances aux saisons fraîche et intermédiaire de la Nouvelle Calédonie et les conditions de reproduction ont été rapidement maîtrisées. Après un début modeste, la production calédonienne a atteint un pic avec plus de 2500 tonnes de crevettes pêchées en 2005. Ce chiffre parait négligeable comparé aux millions de tonnes de crevettes produites dans le monde, mais la Nouvelle-Calédonie représente plus de 80% de la production mondiale de crevette bleue (Gillett, 2008). Elle a ainsi une position dominante sur ce marché de niche. Cette activité implique aujourd'hui 19 fermes de grossissement ainsi que 4 écloseries toutes réparties sur l'ensemble de la côte ouest de l'île. Cette activité est le deuxième produit à l'exportation du pays.

Les élevages calédoniens de crevettes sont jusqu'à présent épargnés des grandes épidémies virales qui ont décimé les élevages de crevettes au niveau mondial, à l'image du syndrome du « white spot » au cours des années 1990 (Karunasagar and Ababouch, 2012; Thitamadee et al., 2016). Cependant, en Nouvelle Calédonie, les élevages sont confrontés à des pathogènes bactériens tels que les *Vibrio* qui impactent fortement la production de crevettes. En bassin de grossissement, ses épisodes de mortalité apparaissent de façon saisonnière et sont essentiellement dus à *Vibrio penaeicida* (Costa et al., 1998; Mermoud et al., 1998) et à *V. nigripulchritudo* (Goarant et al., 2006; Lemonnier et al., 2006). A ces épidémies bactériennes s'ajoutent un déficit de production de postlarves en écloseries, passant de 170 millions de postlarves durant le pic de production en 2005 à moins de 110 millions en 2011. Cette production irrégulière de postlarves n'est pour l'instant pas expliquée. Les causes suspectées sont multiples : présence de pathogènes ou d'une flore microbienne néfaste, qualité physico-chimique de l'eau entrante, qualité des œufs en lien avec la qualité des géniteurs (IFREMER, 2016). Dans ce contexte, bien qu'aucune cause directe n'ait été identifiée, l'administration prophylactique d'antibiotiques est classiquement pratiquée en écloserie durant les dix premiers jours suivant l'éclosion pour améliorer les survies larvaires. Cette utilisation régulière d'antibiotiques est cependant de moins en moins efficace et induit une recrudescence de souches bactériennes, issues de la flore présente dans les élevages larvaires, présentant des résistances aux antibiotiques. Une solution temporaire à ce problème consiste en une rotation de divers antibiotiques à spectre large, mais elle comporte le risque d'apparition de bactéries multirésistantes et une perte totale de l'efficacité des antibiotiques. Une solution plus durable est le remplacement des antibiotiques par des probiotiques.

Différents essais en élevages larvaires de crevettes en Nouvelle Calédonie ont d'ores et déjà été effectués avec des probiotiques commerciaux en vue d'un remplacement des traitements

antibiotiques (Pham com. pers.). Aucun des différents produits testés n'a pu égaler les survies obtenues par l'administration d'antibiotique. Comme alternative, des souches issues de l'environnement local ont été testées et ont conduit à l'identification d'une souche potentiellement probiotique, *Pseudoalteromonas* NC201, permettant l'amélioration de résultats zootechniques tels que la croissance et la survie (Pham et al., 2014).

Le travail de recherche mené dans le cadre de cette thèse a été focalisé sur cette souche bactérienne NC201, afin d'élucider son mode d'action, en évaluant l'impact de l'adjonction de cette souche probiotique dans l'eau d'élevage. Ainsi, il s'agissait en particulier de répondre aux questions suivantes :

Quelles sont les caractéristiques moléculaires de la souche NC201 du genre *Pseudoalteromonas* ? Contribuent-elles potentiellement à son rôle probiotique ?

Quel est l'impact de la souche NC201 sur l'état physiologique de la crevette *L. stylirostris* ?

Afin de répondre à ces questions le travail effectué est présenté en trois chapitres complémentaires.

Le premier a pour but de dresser l'état de l'art des parties impliquées, la bactérie *Pseudoalteromonas* NC201 et la crevette *L. stylirostris*. Ce chapitre traite également de concept de probiotique ainsi que des causes potentielles de cet effet dues aux microorganismes utilisés et des conséquences pour l'animal ciblé.

Le deuxième chapitre est basé sur les résultats des travaux effectués au cours de la thèse et se subdivise en deux parties. La première est organisée autour de deux articles scientifiques, issus du travail d'analyse biomoléculaire et biochimique de la bactérie NC201, à savoir le séquençage du génome complet de NC201 dont l'analyse du potentiel génétique a conduit notamment à l'identification d'une protéine antibactérienne. La deuxième partie est axée sur l'analyse de paramètres indicateurs de l'état physiologique de la crevette en réponse à l'administration de NC201 dans le cadre de stress abiotique et biotique. Cette partie également est organisée autour de deux articles. Le premier est focalisé sur l'impact de la souche NC201 en évaluant l'amélioration globale de la physiologie de la crevette, *L. stylirostris* exposée à des stress, le deuxième article focalise sur l'étude de la modulation des biomarqueurs de la réponse immunitaire chez des crevettes traitées avec NC201 et soumises à une infection par *Vibrio nigripulchritudo*. Cette 2ème partie est complétée par des résultats supplémentaires sur la gestion du stress oxydant lors de ce même stress avec un pathogène de crevette.

Enfin, le troisième chapitre constitue la conclusion générale regroupant les résultats principaux de la thèse au regard de la littérature scientifique publiée afin d'émettre des hypothèses sur les modes d'actions de NC201. Ce chapitre est terminé par les perspectives de travaux complémentaires autour de la relation NC201/*L. stylirostris* et d'applications potentielles de NC201 pour la crevetticulture.

Chapitre I : Rappels bibliographiques

Chapitre I : Rappels bibliographiques

1. Probiotique 9
   1.1. Définition 9
   1.2. Modes d'action des probiotiques 9
      1.2.1. Compétition avec la flore néfaste et/ou stabilisation de la flore bénéfique 9
      1.2.2. Atténuation de virulence des pathogènes 10
      1.2.3. Stimulation du système immunitaire 11
      1.2.4. Amélioration de la nutrition 11
      1.2.5. Amélioration de la qualité de l'eau 12
   1.3. Application en crevetticulture 12
      1.3.1. Historique 12
      1.3.2. Utilisation de probiotiques d'origine terrestre 13
      1.3.3. Utilisation de probiotiques issus d'animaux sains 14
      1.3.4. Utilisation de probiotique environnementaux 14
   1.4. La crevetticulture en Nouvelle-Calédonie 15
      1.4.1. Pathologies en grossissement 15
      1.4.2. Utilisation de probiotiques en Nouvelle-Calédonie 17
      1.4.3. La souche NC201 : un probiotique potentiel 17
2. Le genre Pseudoalteromonas 18
   2.1. Caractéristiques générales 18
      2.1.1. Classification, morphologie et propriétés métaboliques 18
      2.1.2. Etat de la phylogénie : émergence de 2 sous-genres 18
      2.1.3. Un symbiote récurrent 19
   2.2. Activité antimicrobienne 19
      2.2.1. Alcaloïdes 20
      2.2.2. Polykétides 20
      2.2.3. Peptides antimicrobiens 20
   2.3. Espèces de *Pseudoalteromonas* pathogènes pour les élevages marins 21
3. La crevette bleue, *Litopenaeus stylirostris* 21
   3.1. Taxonomie 21
   3.2. Cycle biologique 22
   3.3. Osmorégulation 24
   3.4. Défense immunitaire chez les crevettes pénéides 25
      3.4.1. Reconnaissance du non-soi 26
      3.4.2. Réponse cellulaire 27
      3.4.3. Réponse humorale 27
   3.5. Stress oxydant 29

1. Probiotique

1.1. Définition

Le concept de probiotique a été présenté au début du siècle dernier, par Metchinkov en 1908, (Fuller, 1995), basé sur les observations du bénéfice apporté par le yaourt aux populations bulgares, il n'a alors aucune désignation spécifique. En 1954 Vergin propose le concept de « probiotika » sur une définition proche des nutriments essentiels, mais ce n'est qu'en 1965 que Lilly et Stillwell donnent une définition moderne, une substance produite par un microorganisme favorisant la croissance d'un autre, par opposition à celle d'antibiotique (Hume, 2011). En 1974, Parker définit les probiotiques comme « organisme ou substance qui contribue à l'équilibre de la flore intestinale » (Hume, 2011). A partir de là, les probiotiques sont définis de façon légèrement plus élargie : tout supplément microbien vivant ayant un effet bénéfique pour l'hôte en améliorant son équilibre microbien (Fuller, 1989; Gram et al., 1999) ou ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Salminen et al., 1999).
En aquaculture, les concepts de contrôle/lutte biologique imputable aux microorganismes naturellement présents dans le milieu d'élevage ont été pris en compte (Maeda et al., 1997), cette lutte biologique est due entre autre à la capacité des microorganismes à modifier la composition de la colonne d'eau et du sédiment, même si ce n'est que de façon temporaire (D. J. W. Moriarty, 1999). Les probiotiques sont définis de façon officielle en 2001, conjointement par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels (FAO, 2001).

1.2. Modes d'action des probiotiques

Les modes d'action des probiotiques sont très variés et ont fait l'objet de nombreuses recherches. Les effets bénéfiques pour l'hôte, direct ou indirect, vont de la compétition avec une flore néfaste ou une stabilisation de la flore bénéfique à la stimulation du système immunitaire ou l'atténuation de la virulence de pathogènes en passant par l'amélioration de la nutrition de l'hôte. De plus les probiotiques peuvent impacter la qualité de l'eau et la flore microbienne associée au milieu ou à l'hôte (De et al., 2014; Lakshmi et al., 2013; Zorriehzahra et al., 2016).

1.2.1. Compétition avec la flore néfaste et/ou stabilisation de la flore bénéfique

Les microorganismes se retrouvent dans tous les milieux et tous les organismes supérieurs. Ces flores microbiennes sont retrouvées aux interfaces d'échange où elles peuvent former des biofilms. Ces biofilms représentent une importante concentration en microorganismes appartenant à une ou plusieurs espèces. La flore résidente d'un organisme le protège des invasions pathogènes, notamment par compétition pour les sites d'attachement et les nutriments présents. Dans la cavité intestinale, le biofilm formé par la flore empêche l'adhésion à la paroi. Cette compétition peut être observée sur la surface de toutes les muqueuses de l'hôte : orolabiale, gastro-intestinale et urogénitale (Adams, 2010).
Une autre voie de contrôle de la flore néfaste à l'hôte est la synthèse de molécules inhibant leur prolifération. Ces molécules peuvent provoquer la mort des bactéries pathogènes, effet

bactéricide, ou simplement empêcher leur multiplication, effet bactériostatique. Parmi les molécules impliquées, on retrouve des molécules à activité directe par lyse bactérienne, comme les bactériocines, le lysozyme, le peroxyde d'hydrogène et des molécules (Verschuere et al., 2000) à activité indirecte par la compétition pour les éléments nutritifs clefs tels que les sidérophores (De et al., 2014; Tinh et al., 2007). Parmi les molécules à activité directe, les bactériocines agissent comme des agents antibactériens, il s'agit le plus souvent de peptides de faible poids moléculaire. Ces peptides sont synthétisés par des bactéries telles que les bactéries acido-lactiques (LAB) (Deegan et al., 2006) ou certaines entérobactéries (Papagianni, 2003) et sont déjà utilisés dans de nombreux domaines où la protection contre des bactéries non désirées est primordiale : conservation alimentaire, usages thérapeutiques vétérinaires et phytosanitaires (Defer et al., 2013; Desriac et al., 2010). Dans cette même catégorie, le lysozyme qui possède une activité protéasique, provoque une bactériolyse par clivage du peptidoglycane de la surface des bactéries Gram positives ou dégradation du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives (Jollès and Jollès, 1984). Enfin, bien que non directement synthétisé par le probiotique, le peroxyde d'hydrogène a un effet direct sur les bactéries. Chez les bactéries, la synthèse de peroxyde est indirecte, des enzymes excrétées générant du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. Les enzymes les plus couramment rencontrées sont des oxydases d'acides L-aminés (Lukasheva and Berezov, 2002). Cette production de peroxyde d'hydrogène est utilisée dans les biofilms à des fins de régulation des population bactériennes (Mai-Prochnow et al., 2008). Les bactéries se livrent aussi une compétition indirecte pour les nutriments présents dans le milieu. Le fer est un élément nutritif clef du développement et de l'activité bactérienne souvent présent en faible quantité dans l'environnement. Il y a une forte compétition entre bactéries pour cet élément, induisant certaines bactéries à synthétiser des sidérophores pour capter le fer présent dans le milieu. Par ailleurs, les sidérophores sont considérés comme des peptides antimicrobiens très efficaces (De et al., 2014; Thomas et al., 2004).
L'équilibre de la flore bactérienne peut aussi être modifié par d'autres paramètres tels qu'un processus de fermentation lactique, une modification du pH par la synthèse d'acides organiques ou la synthèse d'enzymes lytiques, comme dans le cas de protéases (Sugita et al., 1997).

1.2.2. Atténuation de virulence des pathogènes

Le quorum sensing utilisé par certaines bactéries permet d'adapter leur métabolisme, en particulier biosynthétique, en fonction de la taille de leur population. Le quorum sensing est couramment impliqué dans les processus pathologiques, la perturbation de ce système serait donc une stratégie d'atténuation de la virulence des bactéries pathogènes (Defoirdt et al., 2006). Les furanones halogénées, par exemple, ont été étudiées comme antagonistes potentielles du quorum sensing et ont déjà montré un effet protecteur contre des *Vibrio* pathogènes chez la truite (Defoirdt et al., 2006; Tinh et al., 2007). Certains probiotiques issus des genres *Lactobacillus* et *Bifidobaterium* ont la capacité de dégrader les molécules signal du quorum sensing utilisées par des bactéries pathogènes (Brown, 2011). Cette capacité à interférer avec le quorum sensing est appelée quorum quenching, cette stratégie a également été étudiée dans des élevages larvaires de *Litopenaeus vannamei* (Zheng et al., 2016).
La fixation cellulaire est considérée comme un facteur de virulence primordial car il permet l'invasion cellulaire et tissulaire par un pathogène (Adams, 2010). Les virus étant des pathogènes intracellulaires obligatoires, sont particulièrement dépendants de cet attachement. Les probiotiques peuvent entrer en compétition pour les sites d'attache aux

cellules et ainsi empêcher l'infection virale. Ce phénomène a été observé chez certains *Pseudomonas*, *Vibrio* et *Corynebacter* protégeant ainsi des cellules de saumon de l'infection au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (IHNV) (Kamei et al., 1988; Lakshmi et al., 2013).

1.2.3. Stimulation du système immunitaire

Un phénomène indirect de l'effet protecteur des probiotiques vis-à-vis des pathogènes consiste dans le renforcement des défenses immunitaires de l'hôte. Les probiotiques pouvant être définis comme une partie d'un microorganisme ayant un effet bénéfique pour l'hôte, les stratégies d'immunostimulation par l'administration de dérivés microbiens peuvent être considérées comme probiotique. La stimulation du système immunitaire peut être déclenchée par l'exposition des animaux aux molécules immunostimulantes des bactéries (lipopolysaccharide (LPS)), levures (glucanes) ou algaux (alginates) (Bachère, 2003). Le LPS est un immunostimulant capable de provoquer le recrutement et la prolifération des hémocytes après injection chez *Crangon crangon* (Lorenzon et al., 1999). Les β-1,3-glucanes issus de levures administrées par voie orale à *L. vannamei* ont eu pour effet de stimuler les gènes impliquées dans l'immunité (Zhao et al., 2013) et augmenter la résistance de juvéniles à une infection par WSSV (White spot syndrome vius) (Rodríguez et al., 2007). Une revue extensive des effets immunostimulants de glucanes d'origines différentes rapporte des utilisations positives en aquaculture sur plus d'espèces (Meena et al., 2013). Une administration alimentaire d'alginate a notamment provoqué chez *L. vannamei* une augmentation de l'expression des gènes immunitaires et une meilleure résistance à *V. alginolyticus* (Cheng et al., 2005b; Yudiati et al., 2016).

1.2.4. Amélioration de la nutrition

Les probiotiques ont été initialement définis par leur amélioration de la nutrition de l'organisme hôte (Hume, 2011) en facilitant la digestion et la disponibilité des nutriments présents ou en synthétisant des composés ayant une valeur nutritive plus élevée que celle des nutriments utilisés. Certaines bactéries, comme *Agrobacterium*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas* ou *Vibrio fluvialis*, peuvent ainsi contribuer au processus digestif par la synthèse d'enzymes excrétées, comme des protéases et des lipases et également des facteurs de croissance (Balcázar et al., 2006; Zorriehzahra et al., 2016). Les probiotiques peuvent interagir avec le phytoplancton par amélioration de la qualité de l'eau, en particulier les concentrations en azote et phosphore dissouts (de Paiva-Maia et al., 2013). Servant de nourriture aux organismes élevés en aquaculture, l'amélioration de la croissance du phytoplancton augmente indirectement l'apport alimentaire en acides gras insaturés et vitamines (De et al., 2014; de Paiva-Maia et al., 2013; Verschuere et al., 2000).

Des auteurs ont démontré que les probiotiques, particulièrement ceux appartenant aux genres *Bacteroides* et *Clostridium*, peuvent être une source de vitamines, d'acides gras et d'acides aminés essentiels (Balcázar et al., 2006; Tinh et al., 2007). Les levures sont aussi connues pour être des probiotiques capables de produire des polyamines qui favorisent la maturation de la flore intestinale (Zorriehzahra et al., 2016).

Il a longtemps été convenu qu'un probiotique devait pouvoir s'implanter de façon permanente dans la flore intestinale mais une présence transitoire a montré également être suffisante (Kesarcodi-Watson et al., 2008). Un apport de monoculture de bactéries lactiques peut rendre ce genre de bactéries dominant dans la flore intestinale sans changer la quantité

de bactéries présentes (Maeda et al., 2013). Certains mélanges probiotiques peuvent radicalement modifier la composition de la flore intestinale (Vargas-Albores et al., 2017).

1.2.5. Amélioration de la qualité de l'eau

Certains probiotiques sont capables d'améliorer la qualité de l'eau et donc les environnements dédiés à l'aquaculture. Les bactéries Gram positif sont connues pour être capables de dégrader la matière organique en suspension de façon plus efficace que les bactéries Gram négatif. Elle convertissent cette matière en biomasse bactérienne et en dioxyde de carbone (Balcázar et al., 2006; De et al., 2014; Zorriehzahra et al., 2016). Des bactéries nitrifiantes peuvent également éliminer des taux d'ammoniaque et de nitrites toxiques (Mohapatra et al., 2013). Des *Bacillus* ont ainsi conduit à baisser la concentration d'azote dissout et l'ammoniaque dans des bassins de *Penaeus monodon* en provoquant la sédimentation de l'azote (Matias et al., 2002). Chez *L. vannamei* un *Bacillus sp.* a aussi provoqué une baisse de l'azote et du phosphore dissout ainsi qu'une minéralisation des protéines (Wang et al., 2005). Chez *P. monodon*, il a été montré que *Streptomyces* peut agir sur d'autres paramètres tels que le pH et l'oxygène dissous, et ainsi maintenir un environnement propice à la croissance de l'hôte (Das et al., 2006). Toujours chez *P. monodon* un probiotique (non décrit) a permis une baisse de l'accumulation de la matière organique et du soufre dans les bassins (Abu Hena et al., 2008). Les probiotiques peuvent également être utilisés pour la bioremédiation de l'environnement aquacole (Kumar et al., 2016). Certains probiotiques sont capables de dégrader les déchets organiques s'accumulant dans l'eau et le sédiment des bassins. Ce contrôle de la matière organique disponible a pour conséquence un contrôle de la flore hétérotrophe totale des bassins et limite la prolifération de pathogènes potentiels. Chez *P. monodon,* des *Bacillus* sont ainsi capables de synthétiser des amylases, lipases et protéases inhibant les *Vibrio* pathogènes et améliorant la qualité de l'eau (Devaraja et al., 2013). Ce type de probiotiques est déjà utilisé *in situ* pour augmenter la qualité de l'environnement en bassins d'élevage chez *L. vannamei* (Wang et al., 2005).

1.3. Application en crevetticulture

1.3.1. Historique

La première utilisation de probiotiques en aquaculture date des essais de Kozasa en 1986. Depuis, la communauté scientifique a porté un intérêt croissant pour leur utilisation, de la première revue portant sur leur utilisation générale (Gatesoupe, 1999) aux revues spécialisées sur leur application en larviculture (Vine et al., 2006) ou à la lutte antivirale en crevetticulture (Lakshmi et al., 2013).

Des utilisations bénéfiques ont été observées chez les crustacés comme chez *Portunus trituberculatus* avec des souches probiotiques de *Vibrio* et *Pseudoalteromonas* (Nogami et Maeda 1992) et chez *Machrobrachium rosenbergii* avec des souches de *Lactobacillus* (Venkat et al., 2004).

En crevetticulture, les risques liés à certaines pratiques de lutte antimicrobienne dans les élevages ont été identifiés depuis plus d'une vingtaine d'années (D. J. W. Moriarty, 1999). En Thaïlande, pour contrer le développement d'une flore néfaste aux élevages, des chlorations de bassins de grossissement ont eu pour conséquence de favoriser la croissance de *Vibrio* luminescents pathogènes (D. J. W. Moriarty, 1999). Cette chloration induit un risque de sélection de souches antibiorésistantes (Murray et al., 1984), d'autant plus que des

antibiotiques ont été largement utilisés dans les élevages dans les années 1990 en Asie. Bien qu'aucun chiffre ne soit confirmé il a été estimé qu'environ 500 tonnes d'antibiotiques ont été utilisés dans les bassins d'élevage de crevettes en Thaïlande en 1994. Cette utilisation déraisonnée est la source principale d'apparition de résistances aux antibiotiques. La crainte d'un transfert de ces résistances à des pathogènes humains prohibe l'utilisation de probiotiques résistants à plusieurs antibiotiques (D. J. W. Moriarty, 1999). Une approche microbienne à la gestion des pathogènes retrouvés en bassins d'élevage de crevette reste préférable aux alternatives chimiques (D. Moriarty, 1999). Les probiotiques, faisant partie de la flore naturellement rencontrée dans des produits alimentaires, la flore intestinale des animaux ou dans l'environnement ne sont généralement pas considérés comme un risque majeur dans le cadre d'utilisation en bassins (D. J. W. Moriarty, 1999).

1.3.2. Utilisation de probiotiques d'origine terrestre

Certains probiotiques isolés et utilisés pour les modèles terrestres ont montré une activité en crevetticulture. Un probiotique couramment utilisé en alimentation humaine, *Saccharomyces cerevisiae*, a conduit à une augmentation de la résistance de *L. vannamei* aux vibrioses après une administration dans l'aliment (Scholz et al., 1999). Un *Lactobacillus plantarum* issu de préparations coréennes de choux fermentés (kimchi) a généré une augmentation des survies en conditions stressantes (injection de *V. alginolyticus*) ainsi que l'augmentation de l'expression de certains gènes immunitaires, comme la prophénol oxydase (ProPO) et la peroxinectine (PE) (Chiu et al., 2007).

Une souche de *Bacillus subtilis* isolée d'aliments fermentés a engendré, après ajout à l'aliment, de meilleures survies chez *L. vannamei* ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'enzymes digestives et la surexpression de gènes immunitaires tels que ProPO, PE, LGBP (lipopolysaccharide-β-glucan binding protein) et sérine protéase (Zokaeifar et al., 2012a, 2012b). Un autre *Bacillus subtilis*, isolé d'une préparation japonaise à base de graines de soja fermentées (natto), a amélioré l'état de santé général de larves de *L. vannamei.* Cet état de santé a été mis en évidence par l'augmentation des taux de survies lors de stress hyper et hyposalins ainsi que d'un stress au nitrite (K.-F. Liu et al., 2010). Cette même souche administrée par l'alimentation à des *L. vannamei* adultes a généré de meilleures survies lors d'injection de *V. alginolyticus* (Tseng et al., 2009). Des mélanges commerciaux de *B. subtilis* et *B. licheniformis* inclus dans une matrice à base de son n'ont par contre pas mené à une amélioration des élevages intensifs ce qui illustre que le portage d'un probiotique n'est pas systématiquement efficace (McIntosh et al., 2000). L'utilisation dans l'environnement marin de microorganismes non adaptés pose la question d'un mode d'administration adapté, ainsi la microencapsulation permettrait une conservation du probiotique jusqu'à son ingestion par l'animal (Boonanuntanasarn et al., 2016; Solanki et al., 2013). Ce concept a même été étendu à l'administration de probiotique *via* une proie vivante, la bioencapsulation (Tan et al., 2016). Enfin un probiotique commercial, destiné aux élevages terrestres, utilisé en combinaison avec deux *Pseudomonas* a montré une augmentation du taux d'hémocytes circulant, une meilleure coagulation et un charge bactérienne réduite dans l'hémolymphe de *Penaeus latisulcatus* (Hai et al., 2009a, 2009b). La combinaison de ces bactéries comme probiotique a un effet sur la survie et la croissance des crevettes supérieur à la somme de l'effet lié à leur administration individuel (Hai et al., 2009b). La posologie est un facteur clef de l'adaptation d'un probiotique. Dans le cas d'une action immunostimulante d'un probiotique par exemple, un surdosage a déjà révélé chez le poisson des mécanismes de tolérance jusqu'alors inconnus (Bricknell and Dalmo, 2005).

1.3.3. Utilisation de probiotiques issus d'animaux sains

Une stratégie de recherche de probiotique consiste à isoler dans la flore intestinale d'animaux sains des bactéries potentiellement bénéfiques. Leur origine étant intestinale ces souches sont systématiquement apportées *via* l'aliment. Des essais en élevages larvaires ont montré une augmentation de la survie des larves après administration de *Bacillus* (Rengpipat et al., 2000). Chez *L. vannamei* une souche de *Bacillus subtilis* a conféré une meilleure résistance des animaux à une infection par *V. parahaemolyticus* (Balcázar et al., 2007). Une autre souche de *Bacillus* a également amélioré la résistance de *L. vannamei* à une infection par WSSV (Li et al., 2009). Isolée dans l'intestin de crevettes saines une souche de *Lactobacillus* a montré en plus d'une amélioration des survies de *L. vannamei* exposée à un stress à *V. harveyi*, la capacité à éliminer *V. harveyi* dans un système de coculture bactérienne (Kongnum and Hongpattarakere, 2012). Les bactéries issues du tractus digestif de *L. vannamei* adultes sains ont également montré une acquisition de bénéfices en larviculture, ainsi *Bacillus* a conduit à augmenter les taux de survies (Luis-Villaseñor et al., 2011).

La source de souches probiotiques peut être la flore intestinale d'une autre espèce de crevette, ainsi une souche de *Pediococcus* isolée chez *Farfantepenaeus californensis* augmente la résistance de *L. vannamei* aux virus WSS et IHHN (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis) (Leyva-Madrigal et al., 2011). De même des probiotiques, *Lactococcus*, provenant de l'intestin de poisson peuvent avoir un effet bénéfique sur l'activité digestive des *Artemia* (Loh and Ting, 2016). Enfin l'administration d'un mélange de plusieurs souches peut résulter en un effet bénéfique comme démontré par l'administration combinée de *Shewanella haliotis*, *Bacillus cereus* et *Aeromonas bivalvium*. Ces souches ont été isolées chez *L. vannamei* et ont conduit à une augmentation élevée du taux de survie de *L. vannamei* lors d'un stress à *V. harveyi,* ainsi qu'à une expression plus haute des gènes impliquées dans l'immunité tels que le récepteur LGBP, la prophénol oxydase (ProPO), le lysozyme ou la pénéidine 3 (Hao et al., 2014). Les probiotiques isolés du tractus intestinal peuvent également être efficaces lors d'une administration par ajout dans l'eau d'élevage. Ainsi une souche *Arthrobacter* isolée chez *L. vannamei* a provoqué une meilleure survie, un gain de poids ainsi qu'une meilleure activité phénoloxydasique et phagocytique chez des juvéniles (Xia et al., 2014).

1.3.4. Utilisation de probiotique environnementaux

L'environnement peut également être source de bactéries probiotiques. Chez *P. monodon* une souche de *Pseudoalteromonas undina* issue de l'environnement marin et ayant un pouvoir vibriostatique, a conduit à de meilleures survies ainsi qu'à une augmentation du rythme de passage de mue des larves après administration dans l'eau (Maeda et al., 1997). *Bacillus coagulans* isolé du sédiment de bassin de *L. vannamei* administré dans l'eau d'élevages larvaires améliore la survie et l'activité digestive par une augmentation de l'activité amylasique, protéasique, lipasique des larves de *L. vannamei* (Zhou et al., 2009).

Comme pour les probiotiques issus des animaux, les souches d'origines environnmentales peuvent être apportées par l'alimentation. Ainsi une souche de *Streptomyces*, issus des sédiments, incorporée dans l'aliment de *P. monodon* a amélioré la qualité de l'eau de l'élevage (pH, oxygène dissout, teneur en ammonique) et le gain de croissance des animaux (Das et al., 2006). Un *Bacillus* isolé de l'environnement marin a amélioré la résistance de *L. vannamei*

subadulte à des stress d'ammoniaque et d'oxygène dissout après une administration orale (Olmos et al., 2011).
De plus, l'environnement est une source d'agent de contrôle biologique tel que le *Bacteriovorax*, une bactérie prédatrice de *Vibrio*. L'efficacité de cette bactérie a été montrée dans le contrôle des *Vibrio* dans les élevages larvaires de *L. vannamei* (Wen et al., 2014).
Une technique d'élevage larvaire super intensive, le biofloc, est basée sur l'accumulation et l'entretien d'une flore complexe, par l'absence de renouvellement d'eau et l'apport de substrats. Ces bioflocs sont utilisés en fin de cycle d'écloserie, chez *L. vannamei* destinée à des élevages à haute densité. De ces bioflocs des souches de *Bacillus* probiotiques ont pu être isolées, ces probiotiques ont permis une diminution de la flore vibrionacée présente dans l'eau ainsi qu'une augmentation de l'immunocompétence de *L. vannamei* (Ferreira et al., 2015).

1.4. La crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

Les premiers essais d'introduction de *L. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie ont été effectués dans les années 1970 par l'Ifremer (alors CNEXO). Ces essais expérimentaux ont conduit aux premières productions commerciales en 1983. Cette filière est vite devenue la deuxième production animale de l'île, après le bœuf, et le deuxième secteur à l'exportation après le nickel.
Depuis les années 90, deux pathogènes sont responsables de mortalités massives de crevettes dans les bassins de grossissement. Plus récemment, dans les années 2000 une baisse encore inexpliquée de la production de larves en écloserie est apparue et constitue aujourd'hui un des freins majeurs de la production.

1.4.1. Pathologies en grossissement

La crevette, *L. stylirostris*, introduite en Nouvelle-Calédonie est issue de populations de crevettes polynésiennes présentant une tolérance naturelle au virus de l'IHHN (Flegel, 2007). En Nouvelle-Calédonie, la production est principalement impactée par deux vibrioses., désignées « syndrome 93 » et « syndrome d'été » (Costa et al., 1998; Goarant et al., 2006, 1998).

Syndrome 93

La maladie appelée « syndrome 93 », ou parfois « syndrome d'hiver » car elle apparaît en saison froide, observée dès 1993, implique une infection par *Vibrio penaeicida* (Costa et al., 1998; Goarant et al., 1998; Mermoud et al., 1998). Ce syndrome se caractérise par un affaiblissement des crevettes et une plus grande sensibilité de celles-ci aux stress. Les animaux affectés présentent une carapace molle et assombrie et leurs muscles s'opacifient. La coagulation de l'hémolymphe est ralentie et des bactéries y sont observables (Mermoud et al., 1998). Ce *Vibrio* a provoqué une chute de de la production calédonienne, passant de 734 tonnes en 1992 à 621 tonnes en 1993, soit un baisse de 15% (Costa et al., 1998). Les juvéniles de *L. stylirostris* sont particulièrement sensibles à cette bactérie pathogène qui s'avère inoffensive vis-à-vis des stades larvaires et postlarvaires en écloserie (Goarant et al., 1998). *V. penaecida* affectent l'ensemble des fermes calédoniennes, et pourrait s'expliquer par la présence du pathogène dans les baies dans lesquelles l'eau alimentant les bassins est puisée (Goarant et al., 2006). Les mortalités observées sont souvent simultanées dans des bassins distants. Les facteurs environnementaux tels que la qualité de l'eau, le climat ou les agents biologiques tels que des virus ou bloom algaux pourraient être impliqués (Mermoud et al., 1998).

Syndrome d'été

Le « syndrome d'été » se différencie du syndrome 93 par son apparition à des températures de l'eau supérieures à 25°C. Au niveau histopathologique, il s'agit d'une vibriose comparable au syndrome 93 (Goarant et al., 2006). Cependant ce syndrome est dû au *Vibrio nigripulchritudo* et a été identifié pour la première fois en décembre 1997, dans des élevages à haute densité, il est depuis enzootique (Goarant et al., 2006; Lemonnier et al., 2006). Trois pathotypes ont été identifiés et définis par leur niveau de pathogénicité : les *V. nigripulchritudo* non pathogènes (NP), moyennement pathogènes (MP) et hautement pathogènes (HP) (Le Roux et al., 2011). Le potentiel pathogène des souches est lié à la présence de plasmides, pA1066 présent dans les souches MP et HP et pB1067 seulement dans les souches HP. Cependant le plasmide pA1066 présent dans les souches HP se distingue de celui présent dans les souches MP par la présence de 4 modules incluant la présence d'un gène codant une toxine, la nigritoxine (Goudenège et al., 2013). La nigritoxine a montré être hautement pathogène pour la crevette *L. stylirostris* et les arthropodes testés (Labreuche et al., 2017). L'apparition du pathotype HP a été un temps limité à une seule ferme mais s'est propagé aux fermes adjacentes cependant il reste dans une zone géographique limitée à la Baie de Saint Vincent, mais les pathotypes MP et NP ont été diagnostiqués dans d'autres fermes en dehors de cette baie(Goarant et al., 2006). Le risque d'apparition de ce syndrome est fortement influencé par certains facteurs environnementaux. En plus de la température déjà décrite, des indicateurs de la dégradation de l'état des bassins, source de stress et d'affaiblissement des animaux, tels que la baisse d'oxygène dissout ou l'eutrophisation croissante semblent favoriser l'apparition de ce syndrome (Lemonnier et al., 2006). La dégradation de ces facteurs est causée par une intensification des pratiques d'élevages. L'augmentation de l'apport de nourriture afin d'accélérer la croissance contribue à augmenter l'eutrophisation. L'accélération de la croissance peut engendrer une augmentation du rythme de mues et ainsi potentiellement augmenter les périodes de vulnérabilité de l'animal.

Ecloserie

Entre 2004 et 2008, une chute de production de postlarves de l'ordre de 25% est observée dans les écloseries calédoniennes. Ce déficit de production des écloseries n'est pas expliqué d'autant qu'aucun agent infectieux n'a pour l'instant été identifié (Pham et al., 2014). Cependant, plusieurs hypothèses tentent d'expliquer le phénomène, telles qu'une baisse de la qualité des géniteurs et/ou une baisse de la survie lors des passages de stades larvaires. Une dégradation de la qualité de l'eau pourrait en être à l'origine (Pham, 2011).

Chez *L. vannamei,* ainsi que d'autres espèces aquatiques, *V. harveyi* est un pathogène identifié des élevages larvaires (Aguirre-Guzmán et al., 2001; Austin, 2010; Austin and Zhang, 2006). En Nouvelle-Calédonie, ce *Vibrio* et aucun autre pathogène n'a été identifié dans les écloseries cependant un traitement antibiotique à large spectre sur les premiers jours suivant l'éclosion assure de meilleures survies. Cependant l'efficacité de ce traitement tend à diminuer. Cette perte d'activité en accord avec le modèle proposé par Maeda et al. (1997), serait due à une sélection progressive d'une flore résistante aux antibiotiques utilisés. En effet, l'apparition de bactéries résistantes résulte du risque lié à l'utilisation des antibiotiques en aquaculture (Alderman and Hastings, 1998). De nombreuses souches de *Vibrio* résistantes aux antibiotiques ont ainsi été observées dans les élevages larvaires de crabes en Australie (Akinbowale et al., 2006) et dans les élevages de *P. monodon* (Tendencia and De La Peña, 2001).

1.4.2. Utilisation de probiotiques en Nouvelle-Calédonie

Dans le cadre des élevages tahitiens de *L. stylirostris* des souches de *Pseudoalteromonas piscicida* ont été isolées, présentant un fort pouvoir inhibiteur de *V. penaeicida* et *Fusarium oxysporum*, deux pathogènes de la crevette bleue, (Saulnier et al., 2000). Aucun essai zootechnique avec ces souches de *Pseudoalteromonas* n'a cependant été rapporté.

Dans le contexte calédonien, des essais d'utilisation de probiotiques commerciaux ont déjà été effectués sur les élevages de *L. stylirostris*. Lors des premiers essais, sur la période 1998-2000, une préparation à base de *Bacillus* a été testée sans effet notoire (Pham comm. pers.). Sur le cycle de 2004 à 2005, deux probiotiques commerciaux, produit par Sorbial et Lallemand, ont été testés en élevages larvaires. La préparation Sorbial a engendré des survies équivalentes au traitement antibiotique alors que la préparation de Lallemand n'a pas montré d'amélioration significative des survies. Sur le cycle de 2007 trois autres produits ont été testés, le Sanolife, composé de *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* ; le Bactocell, composé de *Pediococcus acidilacti* et le Levucell, composé de *Saccharomyces cerevisiae* (Pham comm. pers.). Les deux premières préparations mentionnées n'ont pas montré de différence significative avec le témoin sans traitement alors que le Levucell s'est avéré aussi efficace pour préserver la survie des larves que les antibiotiques, la posologie reste à optimiser (Pham comm. pers.). Castex et al. (2008) ont montré que le traitement alimentaire avec *Pediococcus acidilactici* (Bactocell) améliorait la survie, la conversion alimentaire et la croissance des animaux subadultes. Ce probiotique a par ailleurs amélioré l'état de santé général des crevettes en stimulant leur réponse à un stress oxydant et en augmentant leur balance oxydative totale (Castex et al., 2009).

En 1998-2000 deux souches de *Vibrio* isolées de l'environnement calédonien ont été testées sans succès. En 2011, 8 souches issues d'une campagne de bioprospection ont été présélectionnées pour leur capacité à inhiber des *Vibrio* pathogènes, *V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo* (Dufourcq et al., 2014) et *V. harveyi* (Pham et al. 2014). Sur ces 8 souches présélectionnées, 6 appartiennent au genre *Pseudoalteromonas*.

1.4.3. La souche NC201 : un probiotique potentiel

Une alternative envisageable pour remédier de façon durable à ce déficit de production est l'administration de probiotiques (Pham et al., 2014). La souche NC201 provient d'une collection de souches bactériennes isolées de l'environnement calédonien. Cette collection a été constituée lors d'une campagne de bioprospection menée conjointement par l'Ifremer et l'Institut Pasteur ayant pour but d'isoler des souches bactériennes marines dans des environnements présentant des conditions extrêmes notamment d'exposition aux ultraviolets et à une salinité supérieure à celles rencontrées dans le lagon (Chalkiadakis et al., 2013). Cette souche a fait l'objet d'une identification et d'une caractérisation préliminaire la plaçant dans le genre *Pseudoalteromonas* (Dufourcq et al., 2014). L'activité antibactérienne de NC201 a d'abord été mesurée vis-à-vis de plusieurs souches de *V. nigripulchritudo* et *V. penaeicida* connues pour être pathogènes de *L. stylirostris* adulte. NC201 est également capable d'inhiber *V. harveyi* qui est un pathogène des élevages larvaires d'autres pénéides en dehors de la Nouvelle-Calédonie. L'innocuité de NC201 vis-à-vis des larves de *L. stylirostris* a ensuite été établie suivi d'une comparaison au traitement antibiotique prophylactique. Il s'est avéré que les survies obtenues avec NC201 égalaient le traitement antibiotique, tous deux étant significativement meilleurs que le témoin. L'indice de développement des larves traitées au probiotique était supérieur à celui des larves sans traitement alors que l'indice des larves traitées aux antibiotiques était plus bas (Pham et al., 2014).

2. Le genre *Pseudoalteromonas*

2.1. Caractéristiques générales

2.1.1. Classification, morphologie et propriétés métaboliques

Le genre *Pseudolateromonas* appartient au règne des bactéries, phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Alteromonadales*, famille des *Pseudoalteromonadaceae*. Ce genre a été décrit comme distinct du genre *Alteromonas* auquel il était précédemment associé (Gauthier et al., 1995). Le genre *Pseudoalteromonas*, comme le genre *Alteromonas*, est composé de bactéries marines Gram négatif à activité aérobie. Les *Pseudoalteromonas* sont non sporulantes, en bâtonnets droits ou courbés de 0,2 à 1,5µm de large par 1,5 à 3µm de long. La plupart des espèces ont une motilité assurée par un flagelle polaire non gainé, cependant 2 espèces, *P. luteoviolacea* et *P. denitrificans*, sont connues pour avoir un flagelle gainé. Les membres de ce genre sont non luminescents mais de nombreuses espèces sont capables de produire des pigments. Les *Pseudoalteromonas* sont strictement aérobies et se développent en milieu marin, toutes les espèces se multiplient à 20°C. Les bactéries appartenant à ce genre sont chemoorganotrophes et possèdent un métabolisme respiratoire, mais pas fermentatif. Les *Pseudoalteromonas* possèdent une activité oxydasique, mais une activité de la catalase faible et irrégulière a été trouvée. Parmi les 12 espèces initialement décrites toutes sont positives pour la gélatinase, lipase, lécithinase et DNAase ainsi que capables d'utiliser le D-glucose comme seule source de carbone. Elles ne sont cependant pas capables d'utiliser d'autres sources telles que le D-ribose, le L-rhamnose, turanose, salicine, D-gluconate, glucuronate, DL-glycérate, l'erythritol, sorbitol, méso-inositol, adonitol, la L-valine, L-ornithine et le m-hrydrobenzoate (Gauthier et al., 1995). Au niveau morphologique et métabolique, les *Pseudoalteromonas*, tout comme les *Alteromonas,* ne sont pas différentiables des *Pseudomonas*, c'est leur ratio G+C, situé entre 37 et 50%, qui a permis de les distinguer au niveau génétique. Seule l'analyse de la séquence ribosomique 16S permet la distinction des *Pseudoalteromonas* des *Alteromonas* (Gauthier et al., 1995).

2.1.2. Etat de la phylogénie : émergence de 2 sous-genres

Le genre *Pseudoalteromonas* suscite depuis quelques années beaucoup d'intérêt de par leur capacité à produire des composés antimicrobiens (Offret et al., 2016). Le génome des *Pseudoalteromonas* a donc été étudié afin de trouver les gènes responsables de la synthèse de ces composés. Une étude approfondie récente des gènes présents dans les génomes disponibles a dégagé un niveau d'organisation génétique supplémentaire comprenant deux grandes catégories de *Pseudoalteromonas* : la première, non pigmentée, est proche de *P. haloplanktis* et la seconde rassemble les *Pseudoalteromonas* pigmentés (Bosi et al., 2017). Bosi et al. ont notamment révélé que le core genome, formé des gènes communs à tous les génomes étudiés des *Pseudoalteromonas* dans leur ensemble est inhabituellement bas (7%). Ce taux de gènes partagés monte à 16% si l'on considère les *Pseudoalteromonas* pigmentés seuls, et à 13% pour le groupe proche de *P. haloplanktis*. Une analyse des gènes uniques, c'est-à-dire partagés par aucune autre espèce du groupe observé, montre une proportion de 80% de gènes uniques dans l'ensemble des *Pseudoalteromonas*. Cette proportion descend à 32%

chez les seuls *Pseudoalteromonas* pigmentés et à 50% pour le groupe *P. haloplanktis*. Ce groupe de *Pseudoalteromonas* pigmentés rassemble toutes les souches connues pour la variété et le nombre (10 ou plus) de gènes ayant une activité antimicrobienne. Ces gènes à activité antimicrobienne ont été révélés par l'identification de clusters responsables de la synthèse de composés métaboliques secondaires comme les peptides à synthèse non-ribosomique, les sidérophores ou les bactériocines.

2.1.3. Un symbiote récurrent

Le genre *Pseudoalteromonas* est souvent associé à des organismes supérieurs marins. Certaines espèces ont été isolées en association avec des coraux, *Paragorgia arborea*, tels que *P. paragorgicola* et *P. translucida* (Ivanova, 2002) ou des mollusques tels que la moule, *Crenomytilus grayanus,* ou le pétoncle japonais, *Patinopecten yessoensis*, comme *P. ruthenica* (Ivanova et al., 2002) mais également le calmar totam, *Loligo pealei*, une *Pseudoalteromonas sp.* (Barbieri et al., 2001).

Ces *Pseudoalteromonas* symbiotiques, *via* leur synthèse de molécules antimicrobiennes, confèrent à leurs hôtes des propriétés antibactériennes (Holmström and Kjelleberg, 1999). Barbieri et al. (2001) ont également démontré qu'une souche associée aux sacs larvaires de calmar totam était capable d'inhiber la croissance d'un champignon marin, *Laegenidium myophilum*, et ainsi les protéger d'un recouvrement fongique. *P. tunicata* est également capable d'empêcher la colonisation d'*Ulva australis* par *Rhodosporidium sphaerocarpum*, *via* ses propriétés antifongiques (Franks et al., 2006). Chez l'éponge *Acanthella cavernosa*, l'espèce *P. luteoviolacea* la protège *via* la synthèse de violacéine contre la colonisation par l'annélide *Hydroides elegans* (L. H. Yang et al., 2007). D'autres molécules actives, de nature quinonique et indolique, respectivement extraites d'éponges telles que *Xestospongia* (Longeon et al., 2010) et *Rhopaloeides odorabile* (Longeon et al., 2011) pourraient être d'origine bactérienne. Les espèces *P. tunicata*, *P, citrea* et *P. rubra* sont aussi capables d'empêcher la colonisation des surfaces sur lesquelles elles sont présentes par des algues, comme *Ulva lactuca*, des crustacés , comme *Balamus amphitrite*, ou des annélides, comme *Hydroides elegans* (Holmström and Mccloy, 2002).

Une souche de *P. flavipulchra,* isolée dans le cadre d'élevages sains de turbot, *Scophtalmus maximus*, a révélé un fort pouvoir antibactérien par la synthèse de multiples composés antimicrobiens pouvant être à l'origine d'un effet probiotique (Yu et al., 2012a, 2012b).

Une souche de *Pseudoalteromonas* isolé de la surface d'un galet a révélé une activité antibactérienne contre des *Vibrio* pathogènes de poisson et une capacité à protéger les larves de *Ruditapes philippinarum* (Longeon et al., 2005). Cet effet symbiotique et potentiellement probiotique est dû à la capacité des *Pseudoalteromonas* à réguler la flore par la synthèse de composés antimicrobiens.

2.2. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des *Pseudoalteromonas* est due à de nombreuses molécules de natures très différentes, 69 molécules antibactériennes réparties en 18 familles ont ainsi déjà été identifiées (Offret et al., 2016). Les plus grandes catégories identifiées sont les alcaloïdes, les polykétides, les peptides non-ribosomaux et les bactériocines.

2.2.1. Alcaloïdes

Dans la catégorie des alcaloïdes, le pigment jaune tambjamine possède une activité antimicrobienne longtemps attribuée aux éponges ainsi qu'à certains nudibranches (Carbone et al., 2010) alors qu'elle est synthétisée par les *Pseudoalteromonas* symbiotiques de ces organismes (Burke et al., 2007; Franks et al., 2005). Cette famille de molécules est connue pour ces effets cytotoxiques et génotoxiques (Cavalcanti et al., 2008). Chez *P. tunicata*, les tambjamines ont révélé un spectre d'activité particulièrement large, allant d'une action antifongique (Burke et al., 2007) à vermicide (Ballestriero et al., 2010). Egalement dans la catégorie des alcaloïdes, des molécules hétérocycliques bromées responsables d'activité antibactérienne ont été identifiées chez *P. luteoviolaceus* (Holmström and Kjelleberg, 1999) et *P. flavipulchra* (Yu et al., 2012b). Ces bromo-indoles aux propriétés antibactériennes, cytotoxiques et antioxidantes, ont également été mis en évidence chez des éponges marines (Longeon et al., 2011; Rasmussen et al., 1993) ; ces molécules pourraient être originaires de la flore bactérienne résidente dans ces organismes. C'est dans cette famille chimique que l'on trouve des molécules synthétisées par *Pseudoalteromonas* capables d'inhiber la croissance de champignons marins. Cette activité, due à un indole de la famille des isatines, a notamment été observé associé aux œufs de crevette, *Palaemon macrodactylus*, conférant un effet protecteur (Barbieri et al., 1997).

2.2.2. Polykétides

Les polykétides forment une famille de molécules riches et diverses, produits par des eucaryotes et procaryotes. Ils sont issus de la condensation de plusieurs kétides (groupements acétyles) ou de malonyls sous l'action de polykétides synthases (PKS) (Ridley et al., 2008). Ces molécules sont souvent porteuses d'une activité biologique, en particulier celle de certains antibiotiques tels que l'érythromycine (Zhang et al., 2010) et la tétracycline (Pickens and Tang, 2009). Au sein du genre *Pseudoalteromonas*, seules les espèces *P. phenolica*, *P.luteoviolacea* et *P. flavipulchra* sont connues pour leur capacité à synthétiser neufs groupes des polykétides. Ces polykétides sont la source de nombreux composés phénoliques antimicrobiens et peuvent, en association avec des peptides non ribosomiques, mener à la synthèse des thiomarinols comme chez *P. luteoviolacea* (Murphy et al., 2011). Un polykétide tétrabromé a été identifié chez *P. phenolica*, son composé, MC21-A, s'est avéré bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA) (Isnansetyo and Kamei, 2003).

2.2.3. Peptides antimicrobiens

Les synthétases de peptides non ribosomiques (NRPS) représentent un large groupe d'enzymes multi-modulaires capables de polymériser des acides aminés, acides gras et acides hydroxylés (Strieker et al., 2010). Beaucoup de produits formés par les synthétases de peptides non ribosomiques sont une combinaison de peptides non ribosomaux et de polykétides. Ces formes combinées hybrides peuvent rendre leur distinction difficile, ils sont alors considérés comme appartenant aux deux types de molécules (Offret et al., 2016).
L'activité antibactérienne contre des souches résistantes aux antibiotiques témoigne de la puissance du potentiel antimicrobien des *Pseudoalteromonas*. *P. flavipulchra* s'est déjà avérée capable d'inhiber des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA), *via* la synthèse d'une oxydase des acides L-aminés (Chen et al., 2010). Les oxydases doivent leur activité bactéricide à la synthèse de péroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette oxydase était peu spécifique de la L-lysine, acide aminé pour lequel la production de H_2O_2 était la plus forte,

car l'utilisation d'autres acides aminés tels que la méthionine, la glutamine, l'acide glutamique et la leucine a résulté en une production de H_2O_2 suffisante pour générer une inhibition visible de MRSA (Chen et al., 2010).
Il est intéressant de noter que ces peroxydases sont à l'origine d'un effet cytotoxique et autolytique observé chez les *P. tunicata* (Mai-Prochnow et al., 2008, 2004). Cet effet permet un contrôle de la population de *P. tunicata* lors de la formation d'un biofilm et la maturation de celui-ci.

2.3. Espèces de *Pseudoalteromonas* pathogènes pour les élevages marins

P. piscicida a été la première espèce de *Pseudoalteromonas* dont le potentiel pathogène a été rapporté chez le poisson, l'infection des œufs de *Amphirion clarkii* a conduit à des mortalités autour de 80%. Une souche de *P. undina* a également été identifiée comme modérément pathogène pour le bar, *Dicentrarchus labrax*, des injections de $1{,}8.10^7$ CFU par animal provoquant 100% de mortalité, alors que $4{,}8.10^6$ CFU seulement 10% de mortalité et avec des doses inférieures aucune mortalité (Pujalte et al., 2007). Deux souches de *Pseudoalteromonas* sont associées à des fortes mortalités dans les élevages larvaires de turbot, *Scophthalmus maximus* (Hjelm et al., 2004), ainsi que jusqu'à 98% de mortalité chez les larves de coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus* (Sandaa et al., 2008).
Une étude dans les élevages larvaires de *L. vannamei* a mis en évidence la présence de *Pseudoalteromonas* dans des larves issues d'élevages malades, définis par opposition aux élevages sains dans lesquels les animaux ne présentent pas de signe morphologique de pathologie, mais un comportement alimentaire et des survies standards. Cependant, les souches de *P. piscicida* isolées, issues des animaux pathologiques, se sont avérées que modérément pathogènes vis-à-vis du modèle *Artemia* (Zheng et al., 2016). Un cas pathogène de *P. piscicida* a été rapporté chez les larves de crabes *Portunus pelagicus*, pouvant provoquer 100% de mortalités sur 24h après une administration de 10^6 CFU.mL^{-1} (Talpur et al., 2011).

3. La crevette bleue, *Litopenaeus stylirostris*

3.1. Taxonomie

La crevette *L. stylirostris*, communément appelée "crevette bleue", appartient à l'embranchement des Arthropodes, ordre des Décapodes, famille des Pénéides :

Phylum : Arthropoda
Sous-phylum : Crustacea
Ordre: Decapoda
Famille : Penaeidae
Genre: *Litopenaeus* (Perez Farfante, 1997)
Espèce : *Litopenaeus stylirostris*

Comme tous les Crustacés, les crevettes pénéides sont caractérisées par une métamérisation du corps, divisé en trois parties : tête (ou acron), thorax (ou péréion) et abdomen (ou pléion) terminé par le telson (Figure 1). Chez les Crustacés Décapodes, la tête et le thorax soudés forment le céphalothorax. Les crevettes de la famille des *Penaeidae* sont caractérisées par un rostre à dents en position ventrale et dorsale. *L. stylirostris* possède un rostre très développé

possédant huit et trois dents sur le bord dorsal en position ventrale. Les Pénéides sont aussi reconnues à la présence de pinces aux trois premières paires de pattes thoraciques (péréiopodes). La partie abdominale est composée de 6 segments (métamères) portant chacun une paire de pattes nageuses (pléopodes) sauf sur le dernier segment qui se termine par le telson. La cuticule est lisse et légèrement pigmentée en bleu-vert chez *L. stylirostris,* d'où son appellation « crevette bleue ». Le dimorphisme sexuel est très marqué. Les organes reproducteurs sont appelés thelycum chez la femelle et petasma chez le mâle. Comme tous les arthropodes, les crevettes sont dotées d'un exosquelette. La mue est obligatoire pour croître, cela correspond à un renouvellement de la carapace et l'extraction de l'ancienne.

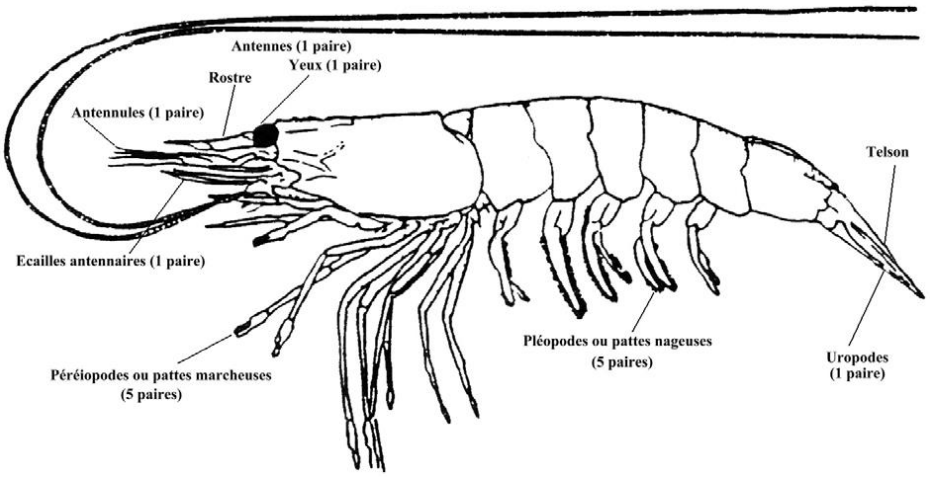


Figure 1 : Morphologie externe d'une crevette pénéide.

3.2. Cycle biologique

Dans le milieu naturel, les crevettes péneides vivent dans de faibles profondeurs (0 à 25 m) et leur distribution est limitée à une zone déterminée par les isothermes de surface de 20°C en été, ce qui correspond à environ 40 degrés de latitude Nord et Sud. L'espèce *Litopenaeus stylirostris* est originaire d'Amérique centrale et du sud, son aire de répartition se situe essentiellement à la hauteur de la ceinture tropicale, plus particulièrement étendue entre le golfe de Californie et le sud du Pérou. *L. stylirostris* a une croissance plus rapide et tolère de plus faibles températures que *L. vannamei* qui est la crevette la plus cultivée dans le monde (FAO).

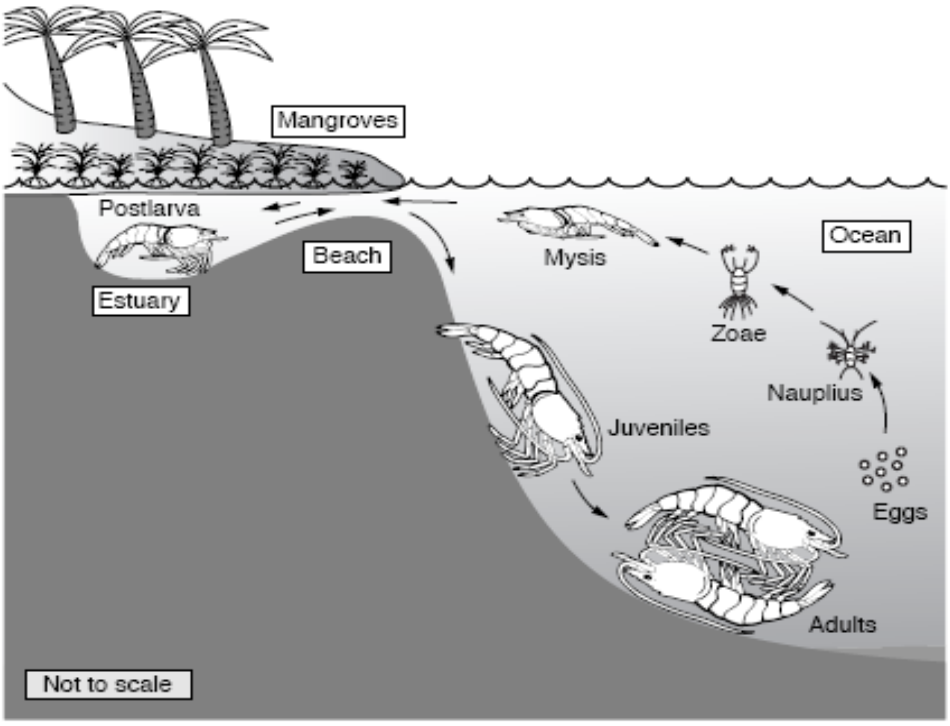


Figure 2 : Cycle biologique des crevettes de mer (Rosenberry *et al*., 2001)

Le cycle biologique (Figure 2) des crevettes pénéides est généralement découpé en trois phases, caractérisées par des changements successifs d'habitat selon les différents stades du développement : la phase méroplanctonique et planctonique en zone océanique et côtière (stades larvaires Nauplius, Zoé et Mysis), la phase benthique, dans les estuaires concernant les postlarves et les juvéniles, et la phase de migration sexuelle durant laquelle les animaux adultes migrent vers le large pour se reproduire.

La fécondation est externe, les ovules étant fécondés au moment de leur expulsion. La ponte a lieu en mer à quelques dizaines de mètres de profondeur. Les œufs passent ensuite d'un état pélagique à benthique par sédimentation. L'éclosion se produit après 10 à 12h de développement embryonnaire, libérant les nauplii dont le développement vitellotrophe comporte six stades successifs. Le stade Nauplius se transforme en larve Zoé (3 stades) ayant un régime exclusif d'algues phytoplanctoniques. Les larves Zoé 3 se métamorphosent en larve Mysis (3 stades), dont le régime alimentaire est strictement carnivore. La dernière métamorphose aboutit au stade postlarve (PL) qui présente alors la majorité des caractéristiques morphologiques de l'adulte. Les PL passent en quelques jours (10 à 20) d'une vie pélagique à benthique et se concentrent près des côtes, dans les estuaires ou les lagunes. Finalement, un mois et demi à deux mois après l'éclosion les animaux ont acquis l'ensemble des caractéristiques morphologiques de l'adulte. Après une période de croissance rapide de quelques semaines en lagune, où la nourriture est abondante, les juvéniles, mesurant alors 8 à 12 cm de longueur, quittent les lagunes pour la bande côtière. Les crevettes vont poursuivre leur croissance en mer pendant 8 à 12 mois avant de redémarrer un cycle reproductif. Le cycle complet prend donc une quinzaine de mois environ à l'état sauvage.

En élevage, un géniteur mature peut être obtenu en 8 à 10 mois. L'obtention d'animaux au stade de maturation sexuelle est une des étapes critiques dans les élevages de crevette. Les animaux sont sélectionnés selon leur taille et leur vigueur, et une attention particulière leur est portée afin d'obtenir plusieurs pontes abondantes et de bonne qualité par animal. Les

crevettes sont donc élevées à faible densité (1-2 / m²), pendant 7-8 mois dans des bassins de terre, jusqu'à dépasser 35g de poids moyen. Ces animaux sont ensuite transférés en bacs de pré-maturation pour 1-2 mois (selon la période de l'année), où la température est régulée pour éviter les fortes variations. Dans cette phase de préparation, le régime alimentaire est de très haute qualité.
Les techniques de fécondation et d'élevage larvaire sont bien maîtrisées, ce qui a permis l'élevage de la crevette bleue et la mise en place de la filière calédonienne. Les différents stades de développement larvaire chez *L. stylirostris* sont décrits ci-dessous.

Stade	Nauplius	Zoé	Mysis	Post-larve
Nombre de stades	5-6	3	3	8
Durée	2 jours	3 jours	3 jours	~ 30 jours
Caractéristiques	œil médian, trois paires d'appendices phototropisme positf	distinction céphalothorax et abdomen, tube digestif fonctionnel 2 yeux à Z1, pédonculés à Z2	pattes thoraciques, appendice caudale, rostre développé	épines sur le rostre, sculpture céphalothoracique, appendices abdominaux soyeux
Habitat	Pleine eau- Haute mer	pleine eau- Haute mer	pleine eau- Haute mer	pleine eau puis fond Se rapproche des côtes
Nourriture	réserves vitellines	phytoplancton	zooplancton	Zooplancton-détritivore
Mode de déplacement	nage par saccades	nage régulière	nage tête en bas avec mouvements brusques de montée	Nage et marche en avant

Principales caractéristiques des stades larvaires et postlarvaires des pénéidés (Pham, 2011)

Chez les Crustacés, l'augmentation de la taille de l'animal nécessite un remplacement de la carapace, la croissance est donc discontinue et régie par des mues successives. Ainsi, le phénomène de mue est une répétition cyclique d'extraction de la carapace précédente comprenant 3 grandes phases : la post-mue (stades A, B), l'inter-mue (stade C), et la pré-mue (D0 à 4). L'inter-mue (stade C), est un état de stabilité physiologique, et ainsi le plus souvent sélectionné dans le cadre de travaux expérimentaux. La détermination du stade de mue des crevettes est réalisée par observation sous loupe bi-occulaire des écailles antennaires ou des uropodes.

3.3. Osmorégulation

Au cours de son cycle biologique *L. stylirostris* évolue dans des milieux de salinités différentes car passe d'un développement larvaire en milieu marin à une étape de croissance juvénile en environnement lagunaire. La différence de potentiel osmotique entre le milieu intra et extracellulaire, qui conditionne les flux ioniques entre le milieu interne de l'animal et l'extérieur, varie donc au cours du développement de l'animal. La capacité osmorégulatrice (CO) est définie comme la capacité de l'animal à réguler ces échanges. Cette capacité à l'osmorégulation tout comme la pression osmotique optimale n'est pas fixe au cours des cycles biologiques de l'animal et varie notamment en fonction de l'âge des individus et de la température (Lemaire et al., 2002). Ainsi la capacité osmorégulatrice évolue au cours de l'ontogenèse et les larves qui sont hyper régulatrices deviennent progressivement hyper-hypo osmorégulatrices après leur métamorphose en postlarve (Pham et al., 2012). Les branchies ont chez les crustacés un rôle important dans cette régulation (Bouaricha et al., 1994; Henry et al., 2012; Péqueux, 1995) du fait en particulier de leur interface avec le milieu extérieur. Chez *L. stylirostris* d'autres organes situés dans la cavité branchiale interviennent dans l'osmorégulation : la pleure particulèrement chez les stades précoces, le branchiostégite et les

épipodites (Pham et al., 2012). L'implication des tissus dans l'osmorégulation est caractérisée notamment par la présence de cellules spécialisées riches en mitochondries, les ionocytes (Pham et al., 2016). Les mouvements d'ions entre le milieu extérieur et le cytosol sont assurés au niveau de la membrane cellulaire par différents transporteurs enzymatiques. Ainsi la combinaison de différentes protéines transmembranaires permettent la régulation du pH cytosolique, l'orientation du flux d'eau et l'accumulation d'ions et molécules dans la cellule. Les principaux effecteurs impliqués sont : la pompe Na^+/K^+ ATPasique et les canaux d'échanges ioniques (Péqueux 1995). Cette pompe et ces canaux vont réguler les flux ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire. Chez *L. stylirostris* le rôle et la localisation de la pompe Na^+/K^+ ATPasique a particulièrement été mis en évidence (Pham et al., 2016).
Le stress osmotique est donc un stress abiotique auquel la crevette est régulièrement confronté qui peut lui être létal s'il est trop prononcé et prolongé. Une meilleure résistance et adaptabilité à ce stress est donc un marqueur d'un meilleur état de santé de l'animal (Lignot et al., 2000).

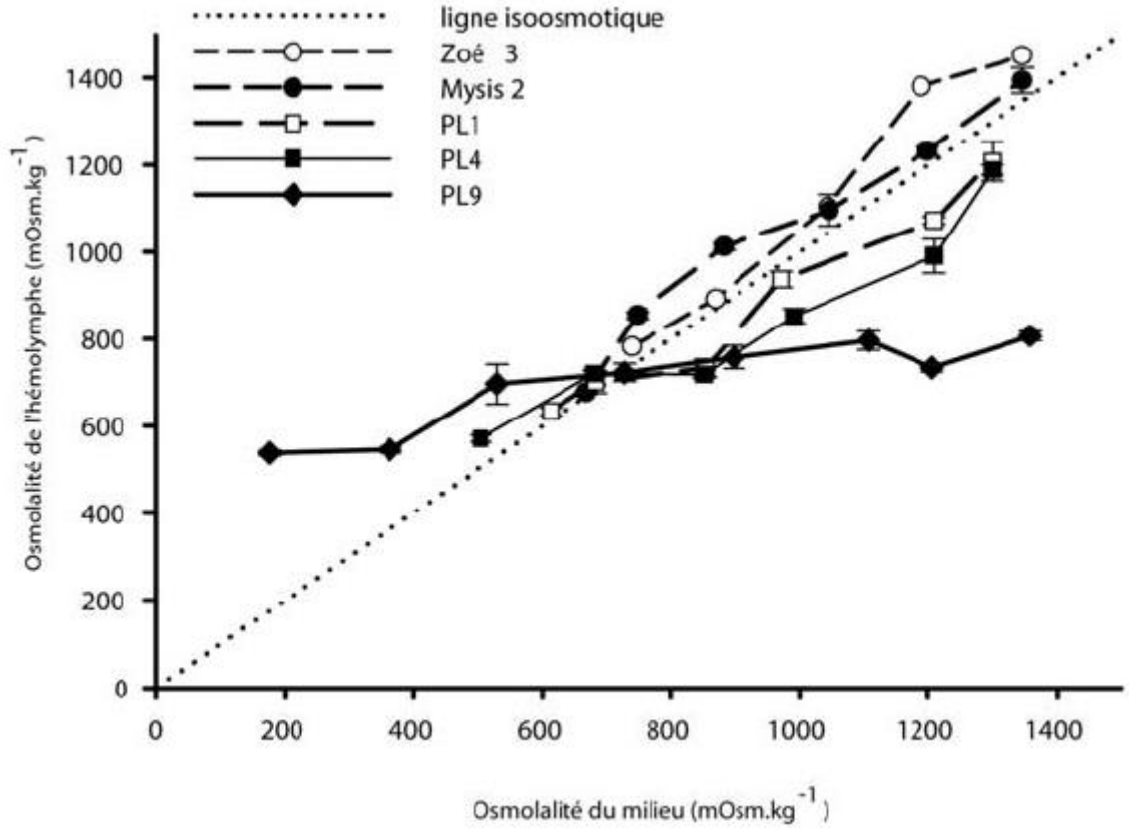


Figure 3 : Variations de l'osmolalité de l'hémolymphe à différents stades de développement en relation avec la salinité du milieu environnant; Ligne diagonale en pointillés: ligne isoosmotique moyenne ± ecart-type (n=3 à 10) (Pham, 2011).

3.4. Défense immunitaire chez les crevettes pénéides

Chez les crustacés, l'immunité est assurée par un système immunitaire inné engendrant une réponse contre un large spectre de pathogènes. L'immunité acquise, basée sur une réponse spécifique à un pathogène *via* la production d'immunoglobulines faisant appel au système mémoire des cellules immunes, est, elle, réservée aux vertébrés. Chez la crevette, la réponse immunitaire assurée par le système inné est initiée par une détection de la présence du non-soi suivie des réponses cellulaires et humorales. La réponse immunitaire s'appuie

principalement sur les hémocytes qui sont impliqués dans la reconnaissance du non-soi, dans la synthèse des molécules antimicrobiennes et dans les processus cellulaires tels que la phagocytose (Bachère et al., 2004, 1995; Rodriguez et al., 1995). Les hémocytes sont les cellules clés de l'immunité chez les crevettes.

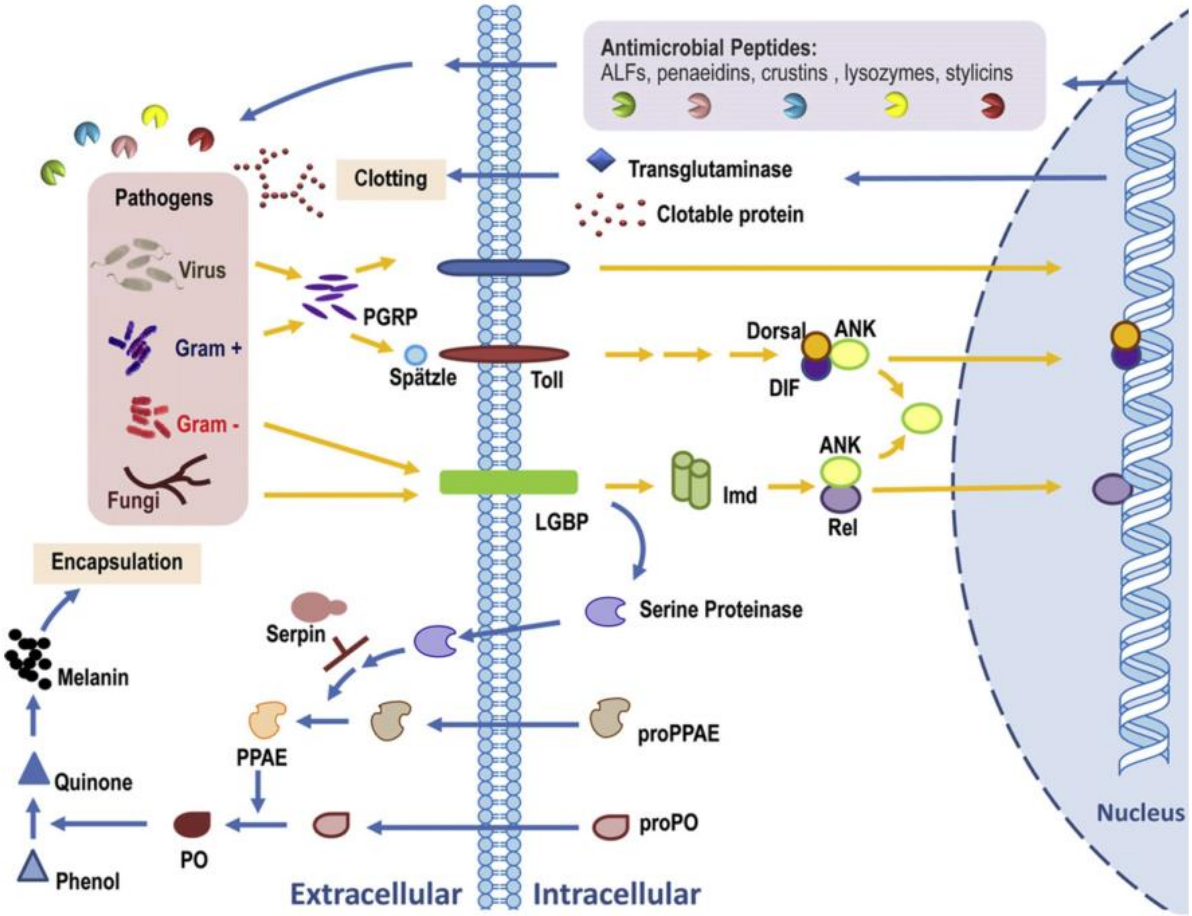


Figure 4 : Schéma de la réponse immunitaire chez la crevette (Tassanakajon et al., 2013)

3.4.1. Reconnaissance du non-soi

La première étape de la réponse immunitaire est la détection de la présence de pathogène par les cellules immunitaires, les hémocytes. Cette reconnaissance des pathogènes se fait grâce à des récepteurs présents sur la surface des hémocytes : les PRRs (Pathogen recognition receptors) (Li and Xiang, 2013a; Tassanakajon et al., 2013). Ces récepteurs sont spécifiques des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Les récepteurs connus sont les protéines liant le lypopolysaccharide (LPS) ou le β-1,3-glucane (LGBP), les récepteurs de type Toll (Toll-like receptor, TLR) et les lectines. Le LGBP reconnaît un motif qui compose la membrane extérieure des bactéries Gram négatif, le lypopolysaccharide (LPS) (Figure 4). Un autre motif est le β-1,3-glucane, il est présent à la surface de bactéries et de champignons. Ces cibles universelles sont détectées par le LGBP et permettent ainsi à l'organisme de repérer une infection à bactérie Gram négatif tels que les *Vibrio* (Chaosomboon et al., 2017; Du et al., 2007; Roux et al., 2002). Les LGBP de *L. vannamei* et *Fenneropenaeus chinensis* ainsi que leurs séquences génétiques sont complètement décrits (Cheng et al., 2005a; Liu et al., 2009). Le β-1,3-glucane, présent dans les parois cellulaires de champignons et certaines bactéries, est reconnu par les protéines liant le β-1,3-glucane (BGBP) (Du et al., 2007). Un type de récepteurs

visant des motifs conservés sont les récepteurs de type Toll (TLR). Ces TLR ont été décrits chez la crevette (Yang et al., 2008; L.-S. Yang et al., 2007) et une surexpression de Toll a été observée dans la réponse immunitaire à *V. anguillarum* chez *Fenneropenaeus chinensis* (Yang et al., 2008). Trois types de Toll ont été observés chez *L. vannamei*, caractérisés par leurs parties extracellulaires riches en leucine. On note que les niveaux d'expression de tous ces TLR sont stimulés par la présence du virus responsable du syndrome de taches blanches (WSSV), alors que seul le Toll1 est stimulé par *V. alginolyticus* (P.-H. Wang et al., 2012).
Différentes lectines ont été identifiées chez les crevettes pénéides, *F. chinensis*, *P. monodon*, *M. japonicus* et *L. vannamei* (Li and Xiang, 2013a). Les lectines sont capables de se lier à des pathogènes et ainsi faciliter leur phagocytose par opsonisation. Par ailleurs, des auteurs ont démontré que les lectines étaient capables de réguler l'expression de peptides antimicrobiens (Wang et al., 2014).
Ces mécanismes de reconnaissance de pathogènes sont à l'origine de déclenchement de cascades impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire. Les LGBP et BGBP sont les points initiaux de la cascade de la prophénol oxydase (ProPO) conduisant à la mélanisation (Li and Xiang, 2013a). Le LGBP *via* son intéraction avec les cibles, active le déclenchement de la cascade de l'immunodéficience (IMD) qui est impliquée notamment dans la régulation des gènes codant les peptides antimicrobiens (AMP) (Li and Xiang, 2013b). Une seconde cascade, liée au récepteur toll-like (TLR) est impliquée dans la réponse aux bactéries Gram positif et aux champignons. Elle régule des gènes codant des effecteurs de l'immunité humorale comme la mélanisation et la coagulation mais déclenche aussi la synthèse de peptides antimicrobiens (Li and Xiang, 2013a).

3.4.2. Réponse cellulaire

Trois types d'hémocytes sont généralement décrits dans la littérature, des hémocytes hyalins (agranulaires), des hémocytes semigranulaires (petits granules) et granulaires (grands granules) (Martin and Graves, 1985; Muñoz et al., 2004; Rodriguez et al., 1995; Zhang et al., 2006). La composante cellulaire de la réponse immunitaire est assurée, chez la crevette, par 2 types d'hémocytes : les hémocytes hyalins impliqués dans les mécanismes de coagulation et les hémocytes granulaires impliqués dans les mécanismes de phagocytose (Bachère et al., 2004). La réaction centrale de la réponse cellulaire est la phagocytose (van de Braak et al., 2002). Cette réponse implique une reconnaissance de l'organisme exogène par un attachement à la surface de celui-ci, facilité par les mécanismes d'opsonisation. Cet attachement est suivi par une internalisation de la cible par enveloppement, puis une lyse est provoquée par fusion avec les phagosomes de l'hémocyte (Bachère et al., 2004). Ces phagosomes sont des organites des hémocytes qui peuvent contenir des enzymes lytiques, notamment protéolytiques, et des molécules à fort potentiel oxydatif, comme des espèces réactives de l'oxygène. Outre la fusion intracellulaire constituant la dernière étape de la phagocytose, le contenu de ces phagosomes peut être expulsé par les hémocytes dans leur environnement immédiat et permettre ainsi la lyse de pathogènes ou d'agrégats trop volumineux pour être phagocytés. Ces hémocytes vont donc libérer du peroxyde d'hydrogène lors de ce phénomène appelé dégranulation.

3.4.3. Réponse humorale

La réponse humorale, comme la réponse cellulaire, est médiée par les hémocytes. Les cellules immunitaires sont le site de production des différentes molécules impliquées dans les

différents mécanismes de la réponse humorale tels que la mélanisation, la coagulation et la synthèse de peptides antimicrobiens (Figure 4). Ces deux mécanismes, mélanisation / coagulation et la synthèse de peptides antimicrobiens, sont fondamentalement différents, la coagulation et la mélanisation ont pour but de piéger les pathogènes, cette immobilisation empêche la dissémination des pathogènes et favorise leur phagocytose. Les peptides antimicrobiens vont agir sur les microbes directement, en provoquant leur lyse ou en favorisant leur phagocytose par opsonisation (Li and Xiang, 2013a; Tassanakajon et al., 2013).

Mélanisation et coagulation

Chez les crustacés la coagulation est un phénomène extrêmement rapide. La coagulation se manifeste dès les quelques secondes après un stimulus de lésion ou d'intrusion d'agent exogène (Yeh et al., 2013). Elle a pour but de stopper les hémorragies et la prolifération des microorganismes dans les tissus. La coagulation plasmatique implique la transglutaminase et consiste en une polymérisation de protéines plasmatiques. La coagulation cellulaire implique un agrégat de protéines issues de la lyse d'hémocytes (Lee & Soderhall, 2002 ; Fagutao et al. 2012). Certaines bactéries sont capables d'échapper à l'emprisonnement dans le caillot par la lyse de celui-ci via des protéases. Une molécule largement présente dans l'hémolymphe, l'α-2-macroglobuline, assure le piégeage des microorganismes dans ces polymères protéiques par l'inhibition de leurs protéases, empêchant de ce fait la lyse du caillot chez *L*. *vannamei* (Lin et al., 2008).

La mélanisation correspond à un phénomène d'encapsulation des pathogènes dans une matrice mélanisée (Jiravanichpaisal et al., 2006). Elle est initiée chez les crustacés par la détection de composants du LPS bactérien par la protéine liant le LPS (LGBP), ainsi que d'autres protéines de reconnaissance de motifs pathogènes (PRR) (Li and Xiang, 2013a). Cette cascade est donc déclenchée par les bactéries Gram négatif et résulte dans l'activation de la sérine protéase (SerProt) (Ren et al., 2009b; Sivagnanavelmurugan et al., 2014). Cette enzyme va provoquer la transformation de la prophénoloxydase (ProPO) en phénoloxydase (PO) (Tassanakajon et al., 2013). Un challenge bactérien conduit à la stimulation de la production de ProPO (Young Lee et Söderhäll 2002).

Peptides antimicrobiens

La synthèse de peptides antimicrobiens (AMP) joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire chez les crevettes pénéides (Bachère et al., 2004).

Une protéine clé de l'activité antibactérienne est le lysozyme qui est une protéase globulaire agissant en dégradant la paroi cellulaire de bactéries. Cette activité non spécifique cible aussi bien les bactéries Gram positif que négatif (de la Vega et al., 2006). Le lysozyme est un acteur essentiel de l'immunité non spécifique chez les pénéides, une stimulation de sa production chez l'hôte par un probiotique serait donc un mécanisme indirect efficace (Burge et al., 2007). Le lysozyme permet aussi une opsonisation non spécifique des bactéries, facilitant ainsi la phagocytose. Chez *L. vannamei* l'expression de ce gène augmente après injection de *V. campbellii* (Burge et al., 2007). La séquence protéique et génétique du lysozyme-C, ainsi que son spectre et son mécanisme d'activité ont été définis chez *L. stylirostris* (Mai and Hu, 2009). Le lysozyme identifié chez *L*. *stylirostris* est en effet efficace contre les bactéries Gram positif et négatif, incluant des *Vibrio* pathogènes, et ce par une activité bactéricide (Mai and Hu, 2009). Les gènes codant le lysozyme peuvent être stimulés chez *L. stylirostris*, lors d'un challenge viral par le WSSV (Mai and Wang, 2010).

Les pénéidines sont des AMPs spécifiquement caractérisées chez les pénéides, elles ont une activité essentiellement contre les bactéries Gram positif, trois pénéidines, Pen1, 2 et 3, ont été initialement décrites (Destoumieux et al., 1997), depuis les Pen4 (Cuthbertson et al., 2004)

et Pen5 (Afsal et al., 2016) ont également été caractérisées. Les hémocytes granulaires sont le site de synthèse des pénéidines, en absence de stress infectieux elles ne sont pas directement excrétées mais stockées à l'intérieur des granules cytoplasmiques des hemocytes. Le relargage des pénéidines dans le plasma est stimulé par un challenge bactérien, couplé au recrutement des hémocytes sur le site d'invasion bactérien, les pénéidines sont massivement exocytées sur le site d'infection (Destoumieux et al., 2000).
Les crustines sont un autre type de peptides antimicrobiens identifié chez *P. monodon* (Antony et al., 2011) tout comme la stylicine ou cryptidin-like, identifiée chez *L. stylirostris* (Rolland et al., 2010). Les crustines comme les pénéidines, peptides antimicrobiens typiques des crevettes, voient l'expression de leurs gènes stimulée par une injection de LPS (Okumura, 2007).
L'expression de gènes codant divers peptides antimicrobiens (AMP), tels que les pénéidines 2 et 3, la crustine, facteur antilipopolysaccharide (ALF), cryptidin-like et le lysozyme, a déjà été évalué dans le cadre d'infection avec *V. penaeicida* chez *L. stylirostris* (de Lorgeril et al., 2008). Presque tous les AMPs, pénéidines, crustine et ALF, voient leur expression stimulée par une infection chez les animaux ayant résistés au challenge bactérien (de Lorgeril et al., 2008).
Des gènes apparemment impliqués dans des mécanismes de réponse distincts peuvent être activés dans une même cascade. Par exemple, la transglutaminase, impliquée dans la coagulation de l'hémolymphe, déclenche également l'expression des gènes du lysozyme et de la crustine, deux peptides ayant une activité antibactérienne (Fagutao et al., 2012).
L'expression des gènes liés à la réponse immunitaire des hémocytes est adaptée au type de pathogène rencontré, ainsi des crevettes exposées à une infection virale présenteront un profil d'expression différent d'une infection fongique. Dans le cas de l'infection fongique une surexpression de gènes liés à la détection et la dégradation d'ADN double brin indique une réponse orientée vers les mécanismes de défense antiviraux alors que dans le cas de l'infection fongique une chute du niveau d'expression des gènes liés à la réponse humorale indique un recrutement hémocytaire sur les sites d'infection (Goncalves et al., 2014). Le profil protéique des hémocytes sera également différent dans le cadre de stress abiotiques tels que le froid (Fan et al., 2013). Chez *L. stylirostris*, les animaux survivants à un pathogène, *V. penaeicida*, avaient un profil d'expression des gènes immunitaires différent soulignant le rôle de certains gènes dans la réponse aux bactéries (de Lorgeril et al., 2005).

3.5. Stress oxydant

Pour la plupart des organismes vivants (animaux, plantes, bactéries), l'oxygène est indispensable pour la production d'énergie (ATP) *via* des chaînes de transport d'électrons au niveau de la membrane interne des mitochondries. La chaîne respiratoire permet la réduction de l'oxygène en eau en plusieurs étapes successives qui génèrent la production intermédiaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Figure 5) (Winston et Di Giulio 1991). Ces radicaux, espèces chimiques possédant un électron libre, présentent un fort degré de réactivité les rendant responsables de dommages cellulaires, par réactions avec l'ADN (Imlay and Linn, 1988), les lipides (Fridovich, 1998) et les protéines (Lesser, 2006). De nombreux facteurs abiotiques (température, salinité, pH, UV, polluants…) stimulent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui, en l'absence de régulation, peuvent entraîner des dommages cellulaires importants. Par ailleurs la production de ces molécules particulièrement toxiques, fait partie intégrante des mécanismes de défenses cellulaires lors d'infections avec des pathogènes (Holmblad and Söderhäll, 1999; Muñoz et al., 2000). Le maintien de l'état de santé des animaux, y compris les crustacés, soumis à des conditions environnementales stressantes

implique donc fortement les systèmes de défenses antioxydantes qui régulent la production cellulaire des ROS.

Il est admis qu'environ 2% de l'oxygène du métabolisme oxydatif est transformé en radicaux superoxydes (O_2^-) qui sont régulés par des métalloenzymes, les superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent leur dismutation en péroxyde d'hydrogène, H_2O_2. Plusieurs types de SOD ont été décrits et diffèrent par les métaux utilisés, seuls ou en association, comme cofacteur (cuivre, zinc, nickel, manganèse ou fer) (Gómez-Anduro et al., 2006; Hao et al., 2014). Généralement deux types de SOD sont retrouvés chez les animaux : une Cu-Zn SOD présente dans le cytoplasme et une Mn SOD dans les mitochondries. Même si le radical superoxyde est faiblement réactif, il peut entraîner la production de radicaux beaucoup plus actifs, tels que les radicaux hydroxyles (*via* la réaction d'Haber-Weiss, en présence de Fer et d' H_2O_2) ou le peroxynitrite $OONO^-$ par réaction avec le monoxyde d'azote. La production de radicaux superoxydes peut également être stimulée dans la plupart des cellules *via* une activité NAD(P)H oxydase (NOX). Cette enzyme initialement étudiée dans les cellules phagocytaires, joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes et intervient dans la signalisation cellulaire. Ainsi lors de la phagocytose, l'activation des NOX et SOD permettent la production au sein du phagosome de radicaux libres, "burst respiratoire", participant à l'activité microbicide (Bachère et al., 1995; Muñoz et al., 2000; Tassanakajon, 2013; Wang et al., 2007).

Le péroxyde d'hydrogène libéré par la SOD, n'est pas lui-même un radical mais une molécule tout de même toxique et peut entraîner la formation, en présence de métaux, d'une espèce radicalaire très délétère, le radical hydroxyle (OH^-). Le taux d' H_2O_2 est donc régulée via la réduction en O_2 et H_2O par la catalase (CAT) mais également par la glutathion péroxydase (GPx) qui catalyse sa réduction par le glutathion (GSH) (Figure 5) (Holmblad et Söderhäll 1999; Hao et al. 2014) . Le glutathion, tripeptide présentant un groupement thiol, possède un fort pouvoir réducteur et peut agir directement avec le peroxyde d'hydrogène, le radical superoxyde, le radical hydroxyle et le monoxyde d'azote (Halliwell et Gutteridge 1999). Le GSH peut également chélater les ions Cu^{2+} et limiter ainsi la production de ROS *via* les réactions de type Fenton. Une enzyme inductible du cytoplasme, la glutathion transférase (GST), catalyse la liaison du glutathion avec certaines molécules, notamment les xénobiotiques mais également les molécules organiques sous leur forme hydroperoxydes, afin de favoriser leur diffusion et élimination (Sherratt et Hayes 2002). Le glutathion intervient ainsi à différents niveaux dans la détoxification cellulaire. En présence d'oxydants, les groupements thiol de 2 molécules de glutathion réagissent pour former un pont disulfure générant la forme oxydée, GSSG. Le ratio GSSG/GSH (ou GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un indicateur du degré de stress oxydant. D'autres enzymes telles que les myeloperoxydases, ou peroxinectines des Crustacés sont également impliquées dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène et la formation d'acide hypochlorique (Holmblad et Söderhäll 1999).

D'autres molécules de petite taille ont des propriétés antioxydantes (acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes) et agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables.

Un déséquilibre cellulaire de la balance pro-antioxydant, *via* une production excessive de ROS ou diminution des capacités antioxydantes, induit un état de stress oxydant (Cheng et Wang 2001). Ce déséquilibre peut être transitoire du fait de l'activation régulée des systèmes de production de radicaux qui est rapidement compensée par une réponse antioxydante efficace. C'est le cas lors d'un burst respiratoire stimulé en réponse à une infection et rapidement régulée (Liu et al., 2007). Mais l'état de stress oxydant peut être durable et est alors associé à

une situation pathologique dont les origines peuvent être multiples : carence alimentaires en antioxydant, stress exogènes de types environnementaux (metaux, UV…).
Dans cet état, la surproduction de ROS ou leur non-régulation peut alors entraîner une oxydation non spécifique et irréversible de molécules biologiques et leur perte de fonction. Y sont particulièrement sensibles l'ADN (mutations), les acides aminés et les protéines (Cardona et al., 2015; Ren et al., 2014). Les ROS induisent également la peroxydation des lipides membranaires, en particulier les acides gras polyinsaturés, formant des hydroperoxydes et des aldéhydes tels que le malondialdehyde. L'altération lipidique des membranes cellulaires peut être particulièrement toxique et engendrer l'apoptose.
L'oxydation des protéines peut induire la formation de protéines carbonylées issues de la fragmentation de chaînes polypeptidiques, de l'oxydation de certains acides aminés ou de l'interaction de leur chaîne latérale avec des produits de la peroxydation lipidique (Levine, 2002).
La balance pro-antioxydant est ainsi souvent étudiée chez les crevettes d'élevage suite à des infections virales ou bactériennes (essentiellement des vibrios) (Ji et al., 2011; Liu et al., 2007; Mathew et al., 2007; Rameshthangam and Ramasamy, 2006). Ces travaux décrivent une chute des défenses antioxidantes associée à des dégâts cellulaires accrus suite à des infections par des virus qui impactent directement les hémocytes, cellules clés de l'immunité. Lors des infections à *Vibrio* les défenses antioxydantes sont stimulées en parallèle à la production des radicaux libres (Duan et al., 2015; Ji et al., 2011; Muñoz et al., 2000).

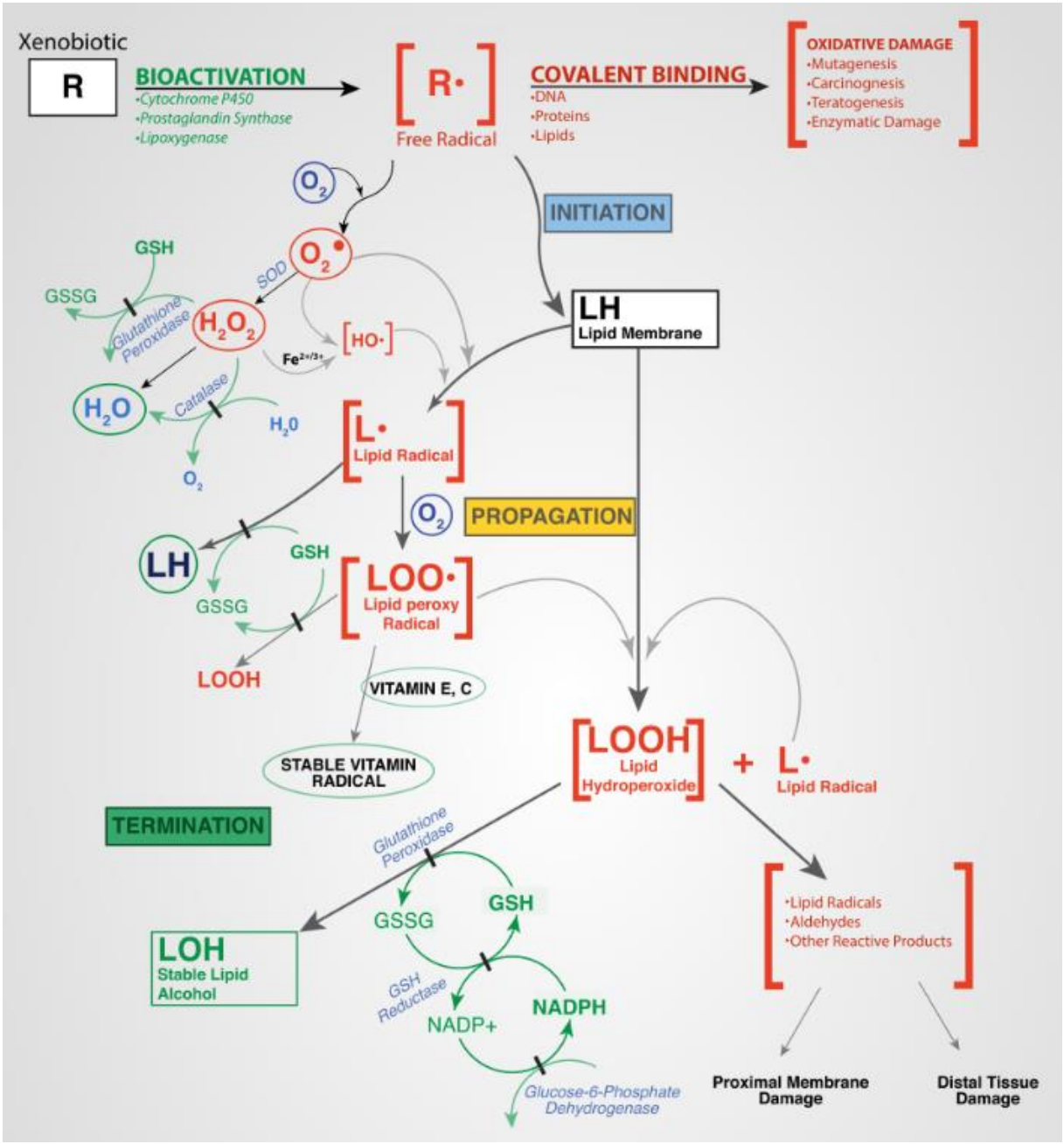


Figure 5 : Stress oxydant, systèmes de défense et cascade de propagation (Dan Cojocari com. pers. 2016)

Chapitre II : Résultats

Chapitre II : Résultats

Partie 1 : La souche NC201, un probiotique potentiel pour les élevages de crevette : séquençage du génome et identification de molécules antimicrobiennes (p. 39)

Publication 1 :

Sorieul L., Rückert C., Al-Dilaimi A., Winkler A., Kalinowski J., Pham D., Wabete N., Boulo V. « Whole genome sequence of *Pseudoalteromonas* sp. NC201, a probiotic strain for *Litopenaeus stylirostris* hatcheries in New Caledonia » (à soumettre à Genome Announcement après la levée de la confidentialité d'Ifremer)

Publication 2 :

Sorieul L., Wabete N., Al-Dilaimi A., Rückert C., Guentas L., Pham D., Amir H., Kalinowski J. and Boulo V. « Characterization and antibacterial activity, *via* a LodA-like protein, of the *Pseudoalteromonas* strain NC201 as a potential probiotic in shrimp hatchery in New Caledonia » (à soumettre à Applied and Environmental Microbiology après la levée de la confidentialité d'Ifremer)

Partie 2 : Administration de NC201 chez *L. stylirostris* : effet probiotique sur la physiologie de la crevette suite à des stress biotique et abiotique (p. 71)

Partie 2.1 : Impact de NC201 sur les paramètres physiologiques globaux de *L. stylirostris* lors de stress infectieux et salins (p. 72)

Publication 3 :

L. Sorieul, N. Wabete, D. Ansquer, J-R. Mailliez, M. Pallud, C. Zhang, M. Lindivat, V. Boulo, D. Pham « Survival improvement by the *Pseudoalteromonas sp*. NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress » (à soumettre à Aquaculture après la levée de la confidentialité d'Ifremer)

Partie 2.2 : Impact de NC201 lors d'un stress infectieux à *Vibrio nigripulchritudo* sur la réponse immunitaire et antioxydante de *L. stylirostris* (p. 99)

Publication 4 :

L. Sorieul, V. Boulo, D. Ansquer, C. Zhang, C. Irvoas, M-M. Le Gall, D. Pham, N. Wabete « Immune response of blue shrimp Litopenaeus stylirostris treated with probiotic Pseudoalteromonas sp. NC201 following infection with Vibrio nigripulchritudo » (pour soummission à Fish and Shellfish immunology après la levée de la confidentialité d'Ifremer)

Résultats supplémentaires :

L'administration de probiotique NC201 impacte les biomarqueurs impliqués dans la réponse au stress oxydant chez la crevette, *Litopenaeus stylirostris*, impact amplifié par *Vibrio nigripulchritudo*

Partie 1 : La souche NC201, un probiotique potentiel pour les élevages de crevette : séquençage du génome et identification de molécules antimicrobiennes

La souche probiotique isolée de l'environnement calédonien, NC201, appartient au genre *Pseudoalteromonas* (Dufourcq et al., 2014). Son potentiel antibactérien contre *V*. *penaeicida*, *V*. *nigripulchritudo* et *V*. *harveyi* ainsi que sa capacité à améliorer les élevages larvaires de crevettes ont été montrés préalablement (Pham et al., 2014). Le genre *Pseudoalteromonas* est composé d'espèces très proches non distinguables par leur séquence ribosomique 16S, ce qui rend difficile l'attribution à une espèce des souches nouvellement isolées.
Dans l'optique de pouvoir approfondir l'étude de la souche NC201, nous avons séquencé son génome complet. Pour avoir un génome complet de bonne qualité deux techniques de séquençage complémentaires ont été utilisées. La première a consisté en un séquençage à haut débit classique (Illumina), grande couverture de read courts (300bp) avec une haute fiabilité de lecture. Malgré l'établissement de banque de séquençage à extrémités appareillées de 8kb, de longues séquences répétées ont empêché la circularisation du génome. La deuxième technique utilisée à cette fin, a été moins conventionnelle (MinION, Oxford Nanopore). Cette technique a nécessité des banques de 20kb et nous a permis de lever les doutes sur les régions à répétitions multiples.
Le génome de la souche NC201 est constitué de deux réplicons, un chromosome de 4,2 Mo et un chromide de 1,3 Mo avec une teneur globale en G + C de 43,3%. Au total, 4 454 séquences codantes ont été identifiées, 3 441 situées sur le chromosome et 1 013 sur le chromide. Ainsi, la disponibilité du génome complet a conduit à l'analyse génomique extensive pour caractériser la souche NC201, à préciser son appartenance au genre *Pseudoalteromonas* et plus particulièrement sa similarité / identité aux souches *P. flavipulchra* et *P. piscicida*. Cependant, la phylogénie complexe et difficile à établir des *Pseudoalteromonas* n'a pas été complétement définie pour la souche NC201 suite à ces travaux. La souche NC201 semble cependant plus proche de *P. flavipulchra* JG1 que de *P. piscicida*, néanmoins il pourrait être envisagé selon les résultats d'homologie, d'inclure les souches NC201 et *P. flavipulchra* JG1 avec l'espèce *P*. *piscicida*, une espèce pigmentée et à fort potentiel antimicrobien.
L'analyse du génome a également permis de confirmer le potentiel antimicrobien par l'identification de 8 clusters de gènes codants pour des métabolites secondaires. Parmi les gènes identifiés certains codent pour des gramicidines ou des peptides à synthèse non ribosomiques. Ces molécules typiquement impliquées dans des activités antimicrobiennes n'ont pas été les seules identifiées chez NC201 : deux séquences codant pour des amino acides oxydases ont été mises en évidence. Une de ces séquences s'est révélée quasi identique à celle identifiée comme responsable d'une activité antibactérienne chez *P. flavipulchra* JG1 (PfaP). L'autre séquence possédait une séquence similaire à une lysine oxydase (LodA-like) également présente chez *P. flavipulchra* mais pour l'instant peu étudiée.
La purification et l'identification des composés antibactériens synthétisés par NC201 ont été réalisées à partir du surnageant de culture de la souche NC201. Une activité oxydasique a été mise en évidence pour une protéine de la taille prédite de la LodA-like (65-70kDa) à partir du génome. Une analyse des fragments issus de la digestion trypsique de cette protéine tend à confirmer qu'il s'agit de la LodA-like, différente de la PfaP de *P. flavipulchra.* Cette LodA serait responsable de la synthèse de peroxyde d'hydrogène à l'origine de l'inhibition de la souche de *V*. *alginolyticus*.

D’autres molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 3kDa) ont également montré une activité antibactérienne et feront l’objet de travaux ultérieurs.

En conclusion, ces travaux, sur le génome et à partir des surnageants de culture de la souche NC201 ont permis de préciser l’identité et la phylogénie de la souche probiotique NC201, ainsi que de caractériser partiellement son potentiel antibactérien susceptible de jouer un rôle central dans les interactions bactériennes, notamment dans la compétition microbienne au niveau les communautés microbiennes environnementales des milieux d’élevage et du microbiote associé à la crevette.

Ces travaux sont présentés dans les 2 publications suivantes :

Publication 1 :
Sorieul L., Rückert C., Al-Dilaimi A., Winkler A., Kalinowski J., Pham D., Wabete N., Boulo V. *«* Whole genome sequence of *Pseudoalteromonas sp*. NC201, a probiotic strain for *Litopenaeus stylirostris* hatcheries in New Caledonia *»* (à soumettre à Genome Announcement après la levée de la confidentialité d’Ifremer)

Publication 2 :
Sorieul L., Wabete N., Al-Dilaimi A., Rückert C., Guentas L., Pham D., Amir H., Kalinowski J. and Boulo V. *«* Characterization and antibacterial activity, *via* a LodA-like protein, of the *Pseudoalteromonas* strain NC201 as a potential probiotic in shrimp hatchery in New Caledonia *»* (à soumettre à Applied and Environmental Microbiology après la levée de la confidentialité d’Ifremer)

Publication 1 : « Whole genome sequence of *Pseudoalteromonas sp*. NC201, a probiotic strain for *Litopenaeus stylirostris* hatcheries in New Caledonia ».

Whole genome sequence of *Pseudoalteromonas sp*. NC201, a probiotic strain for *Litopenaeus stylirostris* hatcheries in New Caledonia

Louis Sorieul[1,2], Christian Rückert[3], Arwa Al-Dilaimi[3] , Anika Winkler[3], Jörn Kalinowski[3], Dominique Pham[1], Nelly Wabete[1] , Viviane Boulo[1]

[1] Ifremer, UR Lagon, Environnement et Aquaculture Durable, 101 Promenade Roger Laroque, BP32078, 98897 Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France
[2] Université de la Nouvelle-Calédonie, Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement, BPR4, 98851 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie, France
[3] Centrum for Biotechnology (CeBiTec), Bielefeld University, Sequenz 1, 33615 Bielefeld

Article to submit to: Genome Announcement

Abstract:
The marine bacteria *Pseudoalteromonas sp.* strain NC201 has shown probiotic potential in *Litopenaeus stylirostris* larval rearing. In this study, the genome of NC201 was sequenced, assembled and finished. This genome consists of two replicons: a chromosome of 4.2 Mb and a chromid of 1.3 Mb with an overall G+C content of 43.3 %. In total 4,454 CDSs are predicted to be present, 3,441 being located on the chromosome and 1,013 on the chromid. The genome contains several gene clusters coding for antibacterial peptides and secondary metabolites forming gene clusters. Among these clusters, bacteriocins and gramicidin/tyrocidin stand particularly out.

Keywords: *Pseudoalteromonas*, probiotic, genome, Nanopore

The *Pseudoalteromonas* strain NC201 was isolated from the coastal environment of New Caledonia (1). This strain showed growth inhibition against *Vibrio* species like the shrimp pathogens (2–4). NC201 displayed antibacterial activity and was tested as a probiotic for *Litopenaeus stylirostris* (1). In order to better understand its effect on shrimp larvae, the genome of NC201 was sequenced.
The initial sequencing of NC201 was done using an Illumina MiSeq sequencer on a TruSeq PCR-free as well as an 8k Nextera MatePair library with a read length of 2x300 bp. Using Newbler v. 2.8, over 1 million reads (315,477,566 bp) were assembled in an initial draft sequence of 5.33 Mbp, resulting in a coverage of 59.1 fold. The initial assembly consisted of 6 scaffolds containing 65 contigs, with 115 contigs larger than 100bp in total and an average G+C content of 43.25%. The two largest scaffolds attribute for the two replicons that make up the genome of *Pseudoalteromonas* sp. NC201: a chromosome of 4.13 Mbp and a chromid of 1.24 Mbp including coding sequences, 3,441 and 1,013, respectively. The remaining 4 consist of repetitive regions like the RRN operons and IS elements. The initial assembly was inspected in CONSED (5), repeats and SNPs were resolved as far as possible based on the MatePair and Paired End data, resulting in 1 scaffold per replicon consisting of 23 (chromosome) and 1 (chromid) contigs, as well as 2 small repetitive contigs.

As at least two of the repetitive regions were too large to be bridged by PCR and Sanger sequencing, a 20 kb insert library was generated according to Oxford Nanopore Technologies manufactors protocol using 2D Sequencing Ligation Kit. The library was loaded as 1/6 part of a library pool onto a R7.3 flowcell and then sequenced using the MinION Mk1 device for approximately 12 hours. 1D and 2D base calling was performed on the Metrichor platform (https://metrichor.com/s/). A total of 1,961 2D reads was obtained, which against which the ends of the contigs were compared using BLASTN (6). Four reads were found that bridged the large repetitive regions and they were used as guides in CONSED, in addition to several Sanger reads bridging some of the shorter repetitive areas. This approach allowed the assembly of one contig per replicon for the circular chromosome and the circular chromid. The contigs were annotated using PROKKA (7), the annotated sequence is available in GenBank [CP022522-CP022523].
The analysis of the genome sequence gives us leads towards understanding the measured antibacterial activity: it could be caused by either short peptides synthesized as secondary metabolites, such as gramicidin. The antibacterial activity could also be caused by synthesis of oxygen peroxide through the degradation of an amino acid by an oxidase, a sequence very closely related to amino acid oxidases found in other *Pseudoalteromonas* has already been identified (8, 9).

The annotated sequence of NC201 genome is available in GenBank [CP022522-CP022523].

Acknowledgments:
Thanks to Andreas Albersmeier, Markus Persicke for their technical assistance and advices choosing analytical tools. This work was set within the DEDUCTION project funded by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), the Provincial Institutions of New-Caledonia (Province Sud, Province Nord et Province des Iles Loyauté) and by the Government of New-Caledonia.

References

1. Dufourcq R, Chalkiadakis E, Fauchon M, Deslandes E, Kerjean V, Chanteau S, Petit E, Guezennec J, Dupont-Rouzeyrol M. 2014. Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine costal environment from New Caledonia. Lett Appl Microbiol 58:102–8.
2. Costa R, Mermoud I, Koblavi S, Morlet B, Haffner P, Berthe F, Legroumellec M, Grimont P. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. Aquaculture 164:297–309.
3. Mermoud I, Costa R, Ferré O, Goarant C, Haffner P. 1998. “Syndrome 93” in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: History and description of three major outbreaks. Aquaculture 164:323–335.
4. Goarant C, Régnier F, Brizard R, Marteau AL. 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio* penaeicida in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. Aquaculture 169:291–296.
5. Gordon D, Green P. 2013. Consed: A graphical editor for next-generation sequencing. Bioinformatics 29:2936–2937.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403–410.
7. Seemann T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30:2068–2069.
8. Mai-Prochnow A, Lucas-Elio P, Egan S, Thomas T, Webb JS, Sanchez-Amat A, Kjelleberg S. 2008. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. J Bacteriol 190:5493–5501.
9. Chen WM, Lin CY, Chen CA, Wang JT, Sheu SY. 2010. Involvement of an l-amino acid oxidase in the activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas flavipulchra* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Enzyme Microb Technol 47:52–58.

Publication 2 : « Characterization and antibacterial activity, *via* a LodA-like protein, of the *Pseudoalteromonas* strain NC201 as a potential probiotic in shrimp hatchery in New Caledonia ».

Characterization and antibacterial activity, *via* a LodA-like protein, of the *Pseudoalteromonas* strain NC201 as a potential probiotic in shrimp hatchery in New Caledonia

Sorieul Louis[1,3], Wabete Nelly[1], Al-Dilaimi Arwa[2], Rückert Christian[2], Guentas Linda[3], Pham Dominique[1], Amir Hamid[3], Kalinowski Jörn[2] and Boulo Viviane[1]

[1]Ifremer, Research Unit "Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durables" in New Caledonia (LEAD-NC) BP 2059, 98846 Nouméa cedex.
[2]Center for Biotechnology, Bielefeld University, 33594 Bielefeld, Germany.
[3]University of New Caledonia, Institute of Exact and Applied Sciences (ISEA), BP R4, 98951 Nouméa cedex.

Article to submit to: Applied and Environmental Microbiology

Abstract:
A yellow pigmented *Pseudoalteromonas* strain, NC201, was isolated from the marine intertidal areas in New Caledonia and used as a probiotic bacterium in shrimp hatchery. The genome of this bacterium was previously sequenced. In this study, an extensive genomic analysis was performed to characterize NC201 and identify specific genes or clusters which were potentially related to antimicrobial activity and the probiotic abilities of strain NC201. The antibacterial proteins, LodA-NC201, belonging to LodA family were identified on two separate genomic structures, one on the chromosome and one on a chromid, coding for 646 (72.5kDa) and 694 (76.9kDa) amino acids, and showing with the PfaP protein of *P. flavipulchra* JG1 24% and 99% of identity, respectively. Antibacterial activities of the NC201 culture supernatant were measured against *Vibrio harveyi, V. alginolyticus, V. nigripulchritudo* and *V. penaeicida*. This wide range of activity might be resulting from the presence of multiple molecules with a molecular weight above 50kDa and below 10kDa. In the fraction above 50kDa, a protein (around 65 to 70kDa) is responsible for an antibacterial activity through hydrogen peroxide production against a *V. alginolyticus*. The protein responsible for the antibacterial activity was identified through enzymatic digestion and mass spectrometry and appeared to belong to the family of amino acid oxidases. In addition, the extensive analysis of the NC201 strain genome composition revealed the presence of multiple gene clusters coding for antibacterial peptides and secondary metabolites. The *Pseudoalteromonas* strain NC201, with its antimicrobial protein arsenal, could play a central role in bacterial interactions and competition in shrimp hatcheries as well as at the level of the host microbiota and the environmental microbial community of breeding site.

Introduction

The pacific blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris,* originating from the Mexican Pacific coast, has been introduced in New Caledonia in 1978 (Mermoud et al. 1998). This species has been farmed due to its adaptability to the environmental conditions and its ability to maintain acceptable growth rates throughout the year. Thus, the production reached its peak with

2500 tons in 2005, but due to vibriosis in rearing ponds the production has since drastically decreased (Costa et al. 1998; Mermoud et al. 1998, Goarant et al. 1998 and 2006). Moreover, a low postlarvae production has been registered in regard to the production capacity since 2008 in hatcheries (ERPA 2016). The reason for the inability of the local hatcheries to produce the needed amount of postlarvae is not yet understood but probably linked to an overall degradation of the larvae's health conditions during the rearing process. Thus, to ensure a regular supply of postlarvae, antibiotics are routinely used in hatcheries as a preventive treatment which leads to the appearance of antibiotic resistant strains. The use of probiotics seems to be the most sustainable alternative to ensure shrimp larvae health (Kesarcodi-Watson et al. 2008; Hai et al. 2009). A probiotic is either a microorganism in its entirety or component(s) of thereof that is beneficial for the health of the host (Irianto and Austin 2002). Probiotics can act by (i) direct inhibition of pathogenic bacteria, (ii) stabilization of a beneficial microflora, or (iii) be a source of valuable metabolites. Thus, probiotics are increasingly used in aquaculture to better control the microflora and to bolster animal health through an improvement of its physiology and/or immunity (Mohapatra et al. 2013; Akhter et al. 2015; Hai 2015; Bajagai et al. 2016).

In 2010, a bio-prospection campaign was led to identify and create a collection of bacteria originating from the marine intertidal areas in New Caledonia (Chalkiadakis et al. 2013; Dufourcq et al. 2014). Among the 493 marine bacterial isolates, seven bacterial strains including six *Pseudoalteromonas* were selected based for inhibiting growth of several pathogenic bacteria of shrimp, namely *Vibrio nigripulchritudo*, *V. penaeicida*, and *V. harveyi* (Pham et al. 2014). The absence of pathogenicity of these bacterial strains and their beneficial impact on young shrimp stages led to the selection of the *Pseudoalteromonas* strain NC201 as a potential probiotic for shrimp hatcheries in New Caledonia.

The *Pseudoalteromonas* genus has been identified as distinct from the *Alteromonas* genus (Gauthier et al. 1995). So far, this genus comprises 54 species of true marine bacteria, i.e. they only grow on marine media, and 3,837 strains are currently listed in the NCBI taxonomy browser. Thanks to the 134 genome assembly projects available on the NCBI repository, whole genome comparisons, allowed the characterization of two sub-families in the *Pseudoalteromonas* genus. One clade of non-pigmented *Pseudoalteromonas* and another of pigmented species with high genetic potential towards the production of antibacterial compounds and secondary metabolites, such as non-ribosomal peptide synthase (NRPS) and bacteriocins (Bosi et al. 2017). The molecules carrying the antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* are extremely varied, they range from enzymes (Chen et al. 2010a; Yu et al. 2012b), antibacterial peptides (Defer et al. 2013), pigments (Franks et al. 2005) to multiple small compounds, both halogenated and non-halogenated (Offret et al. 2016). Among the enzymes, the L-amino acid oxidases (L-AAOs) which catalyze the oxidative deamination of L-amino acids, releasing ammonium and hydrogen peroxide, have been described and several types have been reported (for review Campillo-Brocal et al. 2015). The hydrogen peroxide production is one of the mechanisms used by the lactic bacteria to controls the growth of competitors (Lindgren 1990). Hydrogen peroxide is a small molecule that diffuses rapidly, has high membrane permeability, and is able to affect a wide variety of microorganisms. Recently, a novel class of L-AAOs has been characterized in the marine bacterium *Marinomonas mediterranea*, an L-lysine-ε-oxidase (LodA), previously named marinocine (Gómez et al. 2006; Lucas-Elío et al. 2006; Chacón-Verdú et al. 2014). This LodA was found to be encoded in an operon that contains a second gene coding for LodB, a protein required for post-translational modification generating the cofactor. Similar enzymes were identified in *Pseudoalteromonas*

tunicata (AlpP), *P. flavipulchra* JG1 (PfaP) and *P. flavipulchra* C2 (Mai-Prochnow et al. 2008; Chen et al. 2010a; Yu et al. 2012b, a). In fact these proteins, marinocine and AlpP, were also involved in the bacterial biofilm development (Mai-Prochnow et al. 2004, 2008, Lucas-Elío et al. 2005, 2006).
In this study, we focused our work on *Pseudoalteromonas sp.* NC201, a yellow pigmented strain isolated from the marine environment in New Caledonia. Phylogenetic analysis based on the NC201 genome indicates *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1 as its closest neighbor. The annotation of its genome showed that the NC201 strain is able to generate antibacterial molecules. In addition to the identification of secondary metabolites, two macromolecules belonging to the LodA family were identified which apparently matched with the antimicrobial enzyme(s) whose activity appears to be related to production of hydrogen peroxide, isolated from the NC201 culture supernatant.

Material and methods

Genome analysis and annotation

For phylogenetic analysis two *in silico* approaches were applied using the complete genome sequence of the strain NC201 and the 12 publically available *Pseudoalteromonas* genomes. The first analysis was performed using an open source tool provided by the Kostas Lab (http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/). This tool calculates the average nucleotide identity (ANI) between the 13 genome sequences by identifying the best hits and reciprocal best hits (one- and two-way ANI) between two genomic data sets as described previously (Goris et al. 2007).
The second *in silico* phylogenic analysis was performed using the Genome to Genome Distance Comparison tool (GGDC 2.1) provided by the DSMZ (Meier-Kolthoff et al. 2013). The latest version (GGDC 2.1) was used as an *in silico* alternative for the classical DNA-DNA hybridization approach. Only hits with a score higher than the HSP ratio were accepted since several draft genomes were used for this analysis. Synteny plots between the NC201 and the other *Pseudoalteromonas* genomes were built using the r2cat software. This analysis was made with the package provided by the University of Bielefeld (Husemann and Stoye 2009). In addition to the synteny analysis, the r2cat software provides a possibility to order and orientate the contigs and scaffolds automatically of the genome of interest to the reference genome. Thereby, this tool allows for a comparative assembly of draft genomes using the syntenic data.
The access to the Efficient Database framework for comparative Genome Analyses using BLAST score Ratios (EDGAR) platform (Blom et al. 2009) was given by the University of Giessen. Genomic sequences of the main representatives (20) of the *Pseudoalteromonas* genus were uploaded to a dedicated project (private access). The EDGAR platform allowed us to use various analytical tools on the uploaded genomes, such as the determination of pan and core-genome as well as calculated the phylogenic distance between studied genomes.
The antibiotic and secondary metabolite analysis shell (AntiSMASH (Medema et al. 2011; Blin et al. 2013; Weber et al. 2015)) available online was used to determine the gene clusters present in the NC201 genome that could provide antibacterial properties.

Biochemical characterization of Pseudoalteromonas NC201

Various NaCl concentrations and pH were tested for an optimal growth of NC201 in Zobell broth (28°C, 120 rpm, aerobic). NC201 cultures were performed in 96 well plates, 100 µL of culture at an absorbance of 0.001 were add per well. The range of pH tested went from pH5

to pH10, in increments of 0.5 units of pH, and the salinity range went from 0% to 20% of NaCl (0%; 0.5%; 1%; 5%; 10%; 15%; 20%), control conditions were pH 7.6 and 2.3% NaCl, classical conditions used to produce NC201. Absorbance of cultures was followed every 30 min over 24 h to determine the effect of these parameters on the growth rate of NC201.
A biochemical assay using Biolog microplates (Gen III Microplate, Biolog 1030) was carried out using protocols recommended by the manufacturer (Biolog, Hayward CA, USA). Both available medium in this assay (A and B) were used for the inoculum. The test panel contains 71 carbon sources and 23 chemical sensitivity assays. GEN III dissects and analyzes the ability of the cell to metabolize all major classes of compounds, in addition to determining other important physiological properties such as pH, salt and lactic acid tolerance, reducing power, and chemical sensitivity. Moreover the sensitivity of NC201 was tested toward other antibiotics (ampicillin (0.5 µg), carbenicillin (0.6 µg), chloramphenicol (1.7 µg), kanamycin (0.5 µg), spectinomycin (0.5 µg), erythromycin (0.5 µg) and gentamycin (0.5 µg)). These tests were carried out in Zobell agar inoculated with NC201 in which wells were cut and contained 50 µl of antibiotic to be tested.

Antibacterial compound production in NC201

The production of antibacterial molecules excreted by NC201 was optimized by modifying the Zobell medium and culture conditions. Zobell media were prepared with various quantities of peptone and yeast extract (0.1x; 0.5x or 2x) from quantities in Zobell used initially (peptone: 4 $g.L^{-1}$; yeast: 1 $g.L^{-1}$ of Lewis solution 1x, 2.3% NaCl, pH7.6). NC201 was grown 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h at 28°C under shaking conditions (120 rpm) in 500 mL of medium in 1 L bottles.
Antibacterial activity was investigated from NC201 grown in Zobell broth during 96 h (pH7.6, NaCl 2.3%, 28°C). The bacteria were pelleted by centrifugation (4000 g, 10 min, 4°C) and the supernatant was recovered and filtered on 0.45 µm. Filtration was enough to remove the bacteria from the supernatant as plated filtrate did not show any bacterial growth. The filtrate was then freeze-dried and resuspended with distilled water at a 10 fold concentration and preserved at -80°C.

Separation of molecules from supernatant of NC201

Centrifugal filter devices (Amicon columns Ultra-15, Millipore UFC90 series) were used for molecular weight cutoff extraction according to manufacturer's protocol. NC201 culture supernatant was obtained after incubating in Zobell medium (0.5x: 2 $g.L^{-1}$ of peptone and 0.5 $g.L^{-1}$ of yeast extract) for 96 h at 28°C under shaking (120 rpm). Bacterial cells were pelleted by centrifugation (4000 g, 10 min, 4°C). A volume of 1 L of supernatant was then filtered successively through mixed cellulose esters filters with 1.2, 0.45, and 0.22 µm pore size (RAWG047S6, HAWG047S6 and GSWG047S6 respectively, Merck Millipore). The separation of molecules according to their molecular mass was achieved using successively decreasing molecular weight cutoffs: 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa, and 3 kDa. For each cutoff the collected fractions were pooled separately to a volume of 1ml, which represents a 1000 fold concentration factor of the initial culture supernatant. The flow through recovered (fraction < 3 kDa) was freeze-dried and concentrated 10 fold. The antimicrobial activity of all the fractions was tested following the inhibition assay protocol described below. Proteins were quantified by Bradford assay according to manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich B6916).

Inhibition assay

Inhibition assays were performed on 4 *Vibrio* species: one reference *V. harveyi* (LMG7890), and 3 *Vibrio* isolated in New Caledonia, *V. alginolyticus* OTC^R (oxytretracyclin resistant), *V. nigripulchritudo* and *V. penaeicida*. A bacterial culture at an absorbance of 0.01 was spread on Zobell agar culture medium plates, and 5mm wells were cut out, in which 50µL of the tested solution were placed. The activity was measured by the size of the inhibition halo compared to 50µL of culture medium as a negative control.

Hydrogen peroxide production

The samples (50µL) was placed on wells of a tryptic soy agar (TSA) culture medium plate complemented with Prussian blue precursors, hexacyanoferrate and potassium ferrocyanide, according the protocol of Chen et al. (2010). The oxidase activity was measured by the sensitivity of Prussian blue precursors to hydrogen peroxide, potentially present in sample. Hydrogen peroxide production is revealed by the formation of a blue halo of Prussian blue.

Enzymatic digestion

The fraction above 50 kDa (25µg of total protein) was incubated separately with 3% trypsin, 3% proteinase K and 3% lysozyme solutions during 2 h at 37°C. Sensitivity to enzymatic digestion was determined through inhibition assay using the protocol previously described.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the protocols of Walker (2002) and Laemmli (1970) with the fraction above 50 kDa (10 µg of total protein) using a running gel at 10% of acrylamide and a stacking gel at 4% of acrylamide in denaturating conditions (SDS in gel and in loading buffer (2,1%) without β-mercaptoethanol). A Criterion migration cell (BioRad) was used, in accordance to the user guide provided by the manufacturer. The migration conditions were denaturing due to the presence of SDS in the loading and migration buffer as well as in the gel but the samples were not heat treated. After migration (1 h, 150 V) one lane was stained with silver nitrate and another lane excised and assessed for antibacterial activity with an overlay method. Another gel performed with the same migration of this 50 kDa fraction was excised and tested for hydrogen peroxide production by depositing it on plate containing the TSA-Prussian blue precursor medium agar (previously described), overnight at 28°C.

Protein profiling through trypsin digestion and mass spectrometry

An *in silico* trypsic digestion of the putative protein found on the chromosome and the chromid was performed using the Expert protein analysis system (ExPASy) provided by the Swiss Institute for Bioinformatics (SIB) (Artimo et al. 2012). The peptide mass prediction tool (http://web.expasy.org/peptide_mass) was used with standard settings: trypsin digestion, $[M+H]^+$ ionization and cysteine residues supposed in their reduced form. Up to 5 missed cleavage sites were allowed to account for possible partial digestion.

From the polyacrylamide gel, the active protein band, was excised and submitted to in gel trypsin digestion (37°C overnight). Then the digested fragments of proteins were extracted from gel according to the protocol of Kinter and Sherman (2000) for protein fingerprinting. Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight analysis was carried out using a MALDI-TOF Microflex coupled to the Biotyper 3.0 software (MALDI-TOF, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Samples were included in an α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (HCCA). The range of masses observed was set between 2 and 20 kDa.

Results

NC201 position in the Pseudoalteromonas genus

As described previously (Sorieul et al. article 1 of this manuscript), the genome of NC201 consists of a chromosome of 4.1 Mbp and a chromid of 1.2 Mbp. The comparison of NC201 to other *Pseudoalteromonas* genomes showed an identity percentage over 98% with the *P. flavipulchra* JG1 strain (Yu et al. 2012) and over 95% with two *P. piscicida* strains (JCM 20779 and ATCC 15057). The complete matrix of genome comparison analysis (ANI scores not shown) was calculated and allowed the building of a distance tree of the *Pseudoalteromonas* species based on the scores (Figure 1). It appeared that among members of the *Pseudoalteromonas* genus almost all species are distinct from each other, with a bootstrap value averaging around 0.09, except for a cluster of highly similar genomes formed by NC201, *P. flavipulchra* JG1 and the two *P. piscicida* strains (JCM 20779 and ATCC 15057). For this cluster the overall bootstrap value is 0.024 and it drops to 0.008 between NC201 and *P. flavipulchra* JG1. Moreover two strains of the same species, *P. flavipulchra* JG1 and the type strain *P. flavipulchra* NCIMB 2033, do not cluster together in accordance with a low similarity score.

In addition, 10 *Pseudoalteromonas* genomes, including the genome of NC201, were analyzed through the Genome to Genome distance Calculator (GGDC) (provided by the DSMZ), permitting an *in silico* equivalent of DNA-DNA hybridization assay (DDH) which is usually used to determine a strain membership to a species. The results show that NC201 is very closely related to *P. flavipulchra* JG1 and the two *P. piscicida* strains with hybridization scores over 80 and 60%, respectively. By this standard tool there is a high probability (over 94%) that NC201's DNA to hybridize with *P. flavipulchra* JG1 and thus they should belong to the same species. A lower probability of hybridization to *P. piscicida* is also observed. The probability of NC201's genome to hybridize with *P. flavipulchra* NCIMB 2033 (the type strain of *P. flavipulchra*) and with the others 6 species of *Pseudoalteromonas* tested is null.

NC201 genome structure

The conservation of similar genome sequence arrangement was observed in form of synteny plots. Comparison plots with NC201 were drawn for all recovered *Pseudoalteromonas* genome previously described in Figure 1. Conservation of synteny between NC201 and *P. flavipulchra* JG1 encompasses the full genome with only two major gaps and less than 3% of non-matching sequences. A similar conservation of synteny was also observed when comparing NC201 to the two *P. piscicida* strains (data not shown), with only three significant gaps and up to two sequence inversions. We note a sequence present in both *P. piscicida* strains that was unmatched within the NC201 genome. This sequence seems similarly structured in both strains of *P. piscicida* and is completely contiguous. These regions are similar in size and position. It is noteworthy that the *P. flavipulchra* NCIMB 2033 strain does not show the same similarity as with the *P. flavipulchra* JG1 and the two *P. piscicida* strains, another indication that *P. flavipulchra* JG1 is wrongly classified.

Distribution and identification of NC201 genes

We have determined the core genome shared by 20 selected *Pseudoalteromonas* genomes. A total of 1,200 coding DNA sequences (CDS) have made up the core genome of this selection of the *Pseudoalteromonas* genus. The core genome development curve was calculated with a sub-selection of 15 genomes, it stabilized around 1,372 genes (data not shown). When was

compared to all uploaded *Pseudoalteromonas* genomes, the two NC201 replicons, chromosome and chromid, appeared to possess 135 distinct CDS, with 86 singletons on the chromosome and 49 singletons on the chromid.

A specific focus on the repartition of genes between *P. flavipulchra* JG1 and NCIM2033, *P. piscicida* ATCC 15057 and JCM 20779, and the NC201 strain was done (Figure 2). The results showed that 2,211 genes are common to all five strains. When excluding *P. flavipulchra* NCIM2033 strain, 1,195 more genes are added to a total of 3,406 genes shared by the four remaining strains. Some 562 genes are shared only by the two *P. piscicida* strains and 230 are shared only by *P. flavipulchra* JG1 and NC201. We also noted a total of 216 genes that are only found in NC201 and in none of the 20 *Pseudoalteromonas* genomes analyzed. These singletons are split between the chromosome (138 genes) and the chromid (77 genes). Less than half of these singletons were identified through automatic annotation, 36 and 32 genes were identified in the chromosome and chromid respectively. Interestingly a few potential operons are among these singletons, on the chromosome 10 contiguous genes code for one NRPS (non-ribosomal peptide synthase) cluster, and on the chromid 6 contiguous genes code for a cluster of regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR) and another 7 contiguous genes form a cluster coding for the potential synthesis of siderophores. This cluster also includes two genes involved in the synthesis of lysine as well as one protease precursor. Remaining notable genes on both replicons potentially code for proteases (3), one peptidase, one toxin (HigB1), one antibiotic resistance enzyme (beta-lactamase), and two restriction enzymes. The remaining genes are either associated with constitutional cell metabolism or are only identified as belonging to a gene category with multiple diverse roles and functions.

The 2 NRPS/siderophore clusters revealed by singleton analysis were confirmed by the AntiSMASH analysis of the whole genome. Moreover, multiple gene clusters coding for the biosynthesis of secondary metabolites were found in both chromosome and chromid (Table 1). The identified clusters were analyzed for homology with various bacteria species. A gene homology score was defined as the percentage of genes in the query cluster present in the hit cluster. In the NC201 chromosome, 8 clusters were found, 4 of these clusters have the structure of a NRPS coupled with a type 1 polyketide synthase (T1PKS) forming NRPS-T1PKS clusters. One cluster has a NRPS sequence coupled to an arylpolyene synthase and another cluster has only NRPS sequences in it. The two remaining cluster contain for the first one, a putative bacteriocin and the second has a sequence coding for a lantipeptide. All biosynthetic clusters found in the chromosome present between of various gene similarities to at least one of these *Pseudoalteromonas* strains: *P. flavipulchra* JG1 (30% and 97%), *P. piscicida* (JCM 20779) (30% and 97%), *P. elyakovii* (ATCC 700519) (30% and 97%) and *Pseudoalteromonas* sp (NJ631) (30% and 97%). On the NC201 chromid, a total of 3 biosynthetic clusters were found with one belonging to the NRPS cluster type and the two others to the bacteriocin cluster type. The two clusters coding for a potential bacteriocin biosynthesis follow the same trend as the one found in the chromosome. The similarities found for these two clusters were mainly with bacteria strains belonging to the *Pseudoalteromonas* genus, with lower similarity scores, between 34 and 27%. In contrast the cluster potentially coding for the NRPS has shown a homology score of 51% with *Methylophaga sp.* JAM7 with a conserved synteny. The next best hit has shown 41% of similarity with *Pseudomonas aeruginosa* 19660 but without any synteny conservation between query and hit clusters. Regarding the biosynthetic gene content in the identified clusters we note that similar sequences frequently appeared. The most frequently identified sequences belong to the gramicidin and tyrocidin synthesis pathways which are known to lead to short antibacterial peptides. The sequences identified similar to PKS, while

numerous, did not lead to the identification of complete biosynthesis pathways. The gene structures, identified as potentially coding for a bacteriocin, did not provide further insight in the molecules potentially synthesized. Interestingly a few genes potentially involved in vitamin production were also identified in form of genes similar to the ones involved in the biosynthesis of biotin and carotenoids.

Sequence analysis of the lodA and lodB genes

The automatic annotation of the NC201 genome revealed the presence of two genes coding for proteins belonging to the LodA (lysine oxidase) family, one on the NC201 chromosome and another on the NC201 chromid. Each *lodA* gene was adjacent to another gene similar to *lodB*. On the NC201 chromosome, the ORF was of 1,941 bases in length and the predicted protein resulting from a translation would be of 646 amino acids with expected mass of 72.5kDa. Neither putative signal peptide, nor transmembrane domain have been detected with the Signal P program (version 4.1; Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark [http://www.cbs.dtu.dk]) (Petersen et al. 2011) and with the Dense Alignment Surface method (Stockholm Bioinformatics Center, Stockholm, Sweden [http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/]) (Cserzo et al. 2002). The predicted proteins sequence had 98.9% of identity with a hypothetical protein belonging to the LodA-like proteins found in *P. flavipulchra* JG1 (WP_010604459.1) and 24% of identity (39% of similarity) with the PfaP (AFB71049.1) protein belonging to the LodA proteins, also known as L-lysine epsilon-oxidase described in *P. flavipulchra* JG1 (Yu et al. 2012b). The protein domain was fully preserved and the active site, formed by the x – H – D – C – x amino acid pattern, was also preserved. The amino acids forming this active site were located on the positions 361/430/501/505/508, respectively. A 3D model of the protein was established *in silico* by analogy to already known 3D structures using the Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0 (Phyre² [http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2]) (Kelley et al. 2015). The NC201 LodA-like 3D model had a structural identity of 28% with the reference structure for the L-lysine epsilon oxidase (c3wevA) (Okazaki et al. 2013) (coverage of 99% and confidence score of 100%). This model confirmed that all the residues involved in the active site were located in the pocket structure of the protein responsible for activity.

The highest identity score for the chromid sequence was of 99.9% (100% of similarity) with the PfaP (AFB71049.1), protein described in *P. flavipulchra* JG1 (Yu et al. 2012b). The ORF was of 2085 bases in length and the predicted proteins resulting from a translation would be of 694 amino acids with expected mass of 76.9 kDa. Similarly to chromosome analysis, neither putative signal peptide, nor transmembrane domain has been detected. The protein domain was fully preserved and the active site, formed by the x – C/S – D – C – Q/E/H pattern, was preserved as well. The amino acids forming this active site were at the 381/445/507/511/514 positions, respectively. The 3D model of this protein had 58% structural identity to the reference structure for the L-lysine epsilon-oxidase (c3wevA) (Okazaki et al. 2013) (coverage of 91% and confidence score of 100%). This model also confirmed that all the residues involved in the active site were located in the pocket structure of the protein responsible for activity.

These both genes belonging to the LodA family in NC201 genome were contiguous to a *LodB* sequence. The LodB contiguous sequences on the chromosome and the chromid of NC201 were 99.4 and 100% identical to a FAD-binding monooxygenase (WP_010604460.1) and a FAD-dependent oxidoreductase (WP_010607465.1), respectively, both identified on *P. flavipulchra* JG1. The NC201 LodB showed putative conserved domain FixC which was described in flavin dependent dehydrogenase (COG0644.1) (Marchler-Bauer et al. 2005). The

FixC domain (COG0644) was preserved with an FAD binding site (pfam00890) and an FAD binding domain (pfam01494), respectively. The ORFs corresponding to LodB, started immediately downstream of LodA, with 2 bp and 5 bp of gap between LodA stop codon and the lodB start, and were of 1080 and 1137 bases in length. These ORFs are potentially translated into proteins of 359 (39.9 kDa) and 378 (42.1 kDa) amino acids, in the NC201 chromosome and chromid, respectively.
In NC201, the organization of these two sets of genes appeared similar and organized in an operon-like fashion. Both putative operons show a ribosome binding site (RBS) closely upstream of the LodA in the form of AGGA motives followed by 5-10 nt spacers (Prodigal [http://prodigal.ornl.gov/server.html]) (Hyatt et al. 2010, 2012). The operon found in the chromosome seemed to have the following promoting sites: the -10 bp box might be formed by the AAGCAAAAT pattern while the -35 nt box might be formed by the TTCCCT pattern. The operon found in the chromid seemed to have the following promoting sites: the -10bp box might be formed by the TGTTGTTTT pattern while the -35 nt box might be formed by the TTGAGT pattern (BPROM [http://www.softberry.com]). In downstream palindromic sequences were found, on the chromosome 16 nt downstream of LodB (TTGTTTGGATTAAAGAAGTGTTTGGATCGAAAGAA) and on the chromid also 16nt downstream of Lod B (AGAATAACAACTGCTTGCGCATAAGTTGTTATTCT).

Biochemical characterization and culture conditions of NC201

NC201 was able to grow at a wide spectrum of pH, ranging from pH 5.5 to 10, with an optimum between pH 5.5 and 8.5. No growth at pH 5 and at pH 10 was observed. Growth rates were halved between pH8.5 and 10. NC201 also tolerated variable medium salinities, and grow on a range from 0.1 to 10% (w/w) of NaCl in the growth medium. The optimal growth range being between 0.5 and 5% of NaCl, the growth rate was halved at 10% of NaCl and divided by 3 at 0.1% NaCl. In medium without NaCl or above a concentration of 10%, NC201 did not grow.
The Biolog analysis has shown that, depending on the inoculation medium used, NC201 was able to grow using 23 of the 33 sugars tested, but could reliably grow only with 4 of the 12 amino acids and 7 of the 26 acids tested (Table 2). NC201 has shown to be oxidase positive but catalase negative. The strain was positive for the assimilation of sucrose, $_{D}$-turanose, stachyose, α-$_{D}$-lactose, $_{L}$-lactose, $_{D}$-melibiose, $_{D}$-salicin, α-$_{D}$-glucose, $_{D}$-galactose, 3-methyl-glucose, $_{D}$-fucose, $_{L}$-fucose, $_{L}$-Rhamnose, $_{D}$-sorbitol, $_{D}$-mannitol, glycerol, glycyl-$_{L}$-proline, $_{D}$- and $_{L}$-serine, α-hydroxy-butyric acid, β-hydroxy-$_{D,L}$-butyric acid, propionic acid and formic acid. Regarding general chemical sensitivity we can note a resistance of NC201 to 2 antibiotics, lincomycin and gentamycin. Through further antibiograms, a resistance of NC201 was also observed for carbenicillin (60 µg.mL^{-1}), kanamycin (50 µg.mL^{-1}), penicillin (50 µg.mL^{-1}), spectinomycin (50 µg.mL^{-1}), while a loss of phenotype (sensitivity or non-growth) was observed for 3 antibiotics, erythromycin (50 µg.mL^{-1}), ampicillin (50 µg.mL^{-1}), chloramphenicol (170 µg.mL^{-1}). More details on biochemical characterization of the NC201 strain are listed in table 2.

Antimicrobial activity of NC201

The filtered culture supernatant of NC201, after being freeze-dried to a 10 fold concentrate, showed an antimicrobial activity against *V. harveyi, V. alginolyticus*, *V. nigripulchritudo* and *V. penaecida*. A homogenous inhibitory effect was recorded on *V. alginolyticus* with an inhibition halo of 8mm in diameter, while the measured inhibition halos against *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo* and *V. penaecida* were between 4 and 5mm in diameter. The optimum

culture conditions of NC201 for a maximal excretion of antimicrobial molecules was in Zobell medium with only 0.5x of standard nutrient content (28°C, 96 h, 120 rpm). However an inhibitory effect was already measured after 72 h of incubation in 0.5x and 1x standard nutrient content medium. Cultures were extended to 96 h incubation to maximize the amount of secondary metabolites. Supernatant of cultures with 0.1x of nutrient showed a low inhibition whereas cultures in 2x nutrient medium did not show any inhibition. No inhibition was obtained with the sterile concentrated Zobell medium (negative control). For the sake of limiting background noise due to medium leftover, the 0.5x nutrient medium and 96 h cultures were selected for further analysis.

The molecules present in the NC201 culture supernatant were separated according to their molecular weight. The fraction containing molecules above the 50kDa cutoff displayed a sharp inhibition edge against *V. harveyi, V. alginolyticus*, *V. nigripulchritudo* and *V. penaecida*. Inhibition assays against *V. alginolyticus* led to an inhibition halo of 12 mm in diameter (figure 3.I a) while the others *Vibrio* showed a halo of 8 mm (data not shown). The fractions reaching from 50 to 30 kDa and from 30 to 10kDa showed no inhibitory activity (figure 3.I, b and c). The fractions from 10 to 3 kDa (10-3 kDa) and below to 3 kDa (flow though) also showed an antibacterial activity against *V. alginolyticus,* the inhibition halos were 4 to 6mm in diameter respectively (figure 3.I, d and e) with a more diffuse effect along the edges of the inhibition zone. Inhibition halos of 1 mm were also observed with the fraction 10-3 kDa toward *V. nigripulchritudo* and *V. penaeicida*, while inhibition halos of 2 mm were obtained with the fraction below 3 kDa for the same *Vibrio* (pictures not shown). These fractions were not tested against *V. harveyi*.

In addition, an oxidase activity was observed with the fraction above 50 kDa by producing of hydrogen peroxide (H_2O_2) which led to a blue halo of 6mm in diameter in TSA plate containing Prussian blue precursor (figure 3-II a). The blue halo, due to H_2O_2 production, showed a diameter identical to the inhibition halo against *V. alginolyticus* (figure 3-II b).

The heat treatment of the active fractions showed the thermostability of fractions 10-3 kDa and below 3 kDa which remained active after heat treatment at 95°C for 2 h. The fraction above 50 kDa showed a decrease in inhibition activity after 1 h at 28°C, 37°C and 50°C, but the activity was only completely lost after 1 h at 60°C (figure 3.III a and b).

Enzymatic digestion, only performed for the fraction above 50kDa, led also to loss of activity after 6 h of digestion at 37°C with proteinase K, and a faint inhibition activity was still visible after trypsin and lysozyme digestion.

Identification of an excreted oxidase linked to Pseudoalteromonas NC201 antibacterial activity

The fraction above 50 kDa recovered of the NC201 culture supernatant was run in SDS-PAGE conditions. After staining with silver nitrate, it appeared that this fraction over 50 kDa contains several proteins of sizes ranging from 10 kDa to almost 200 kDa (figure 4A). The overlay inhibition assay and incubation on a hydrogen peroxide sensitive medium showed both an inhibitory activity against *V. alginolyticus* and a production of hydrogen peroxide localized on a stained band around 65-70 kDa (plain arrow, figure 4B and C).

Trypsin digestion and mass spectrometry profile

The *in silico* digestion of the LodA-like and LodA proteins found in chromosome and chromid respectively, resulted in a list of potential peptidic fragments which the theoretical masses have been predicted. These predicted masses of peptides produced by a partial digestion of

the LodA-like protein were compared with the experimental masses obtained *via* MALDI-TOF analysis from NC201 digested proteins extracted from SDS-PAGE gel. Only the masses matching within 1 uma are listed (table 3). A total of 24 fragments were identified, the protein sequence covered by these fragments accounts for 526 amino acids out of the 646 amino acids coded by the LodA-like gene, this represents a coverage over 80%. It is notable that multiple fragments were only partially digested, with up to 5 missed cleavage sites. A similar comparison between experimental masses and predicted masses from the chromid LodA protein showed 10 fragments matching within 1 uma, accounting for 69% coverage of the LodA amino acid sequence (data not shown).

Discussion

Since some species from *Pseudoalteromonas* genus have been identified as symbionts of multiple marine animals and often associated with an ability to control or stabilize microflora (Holmström and Kjelleberg 1999; Holmström and Mccloy 2002; Franks et al. 2006; Penesyan et al. 2009; Dheilly et al. 2010; Zeng et al. 2011), strain NC201, isolated from a marine area in New Caledonia, has been considered as a potential candidate for probiotic use in shrimp hatchery (Pham et al. 2014). Strain NC201 had been clearly identified as belonging to *Pseudoalteromonas* genus but since this genus is itself a former sub-clade of the *Alteromonas* genus, their ribosomal 16S sequences are very similar. Scores above 98% of identity, on 16S RNA sequences, were traditionally considered as an indicator of the two compared organisms belonging to the same species. This threshold has been lifted up to 99.5% of similarity, but there is still no universally recognized threshold (Janda and Abbott 2007). Neither definition allows us to confidently identify NC201 as belonging to a specific *Pseudoalteromonas* species based on the sequence analysis of ribosomal DNA alone. This led us to look for analysis based on the complete genomic sequence of NC201 (Sorieul et al. submitted). In this study, it appears that the NC201 genome is closely related to the two *P. piscicida* strains ATCC 15057 and JCM 20779 (95.41 and 95.39% ANI scores respectively) gathered and even closer to the *P. flavipulchra* JG1 strain (98.46%). It is noteworthy that neither JG1 nor NC201 match with the *P. flavipulchra* NCIMB 2033 strain. As *P. flavipulchra* NCIMB 2033 is the type strain of this species, it stands to argue that *P. flavipulchra* JG1 is wrongly classified and could belong to the species *P. piscicida.* However, according to the results of DDH, we could also consider that *P. flavipulchra* JG1 and NC201 constitute a sub-species of *P. piscicida* or a closely related new species. This consideration is reinforced by the presence of a short region in *P. piscicida* genomes which does not match with NC201. These regions are similar in size and position and could correspond to a foreign DNA insert like a plasmid or another mobile genetic element, which are frequent in the *Pseudoalteromonas* genus (Bosi et al. 2017). A deeper study of the *Pseudoalteromonas* genus might help to reorganize and tidy up the taxonomy.

Gene repartition results identify different gene groups shared by the 5 compared strains of *Pseudoalteromonas*, NC201, *P. flavipulchra* JG1 and NCIMB 2033, *P. piscicida* ATCC 15057 and JCM 20779. The diagram highlights the repartition of similar genes between strains (Figure 2). We observe that 2,211 genes are common to all compared strains, which is higher than the genus core genome. We also note 1,195 genes are shared by NC201, *P. flavipulchra* JG1, *P. piscicida* ATCC 15057 and JCM 20779 excluding the *P. flavipulchra* NCIMB 2033 strain. This result further confirms the disparity between the *P. flavipulchra* JG1 and NCIMB 2033 strains on a genetic level since genomic sequence and gene content seem very different, and reinforced the idea to consider NC201 as a sub-species of *P. piscicida,* potentially including *P. flavipulchra* JG1.

The *Pseudoalteromonas* genus is known for the ability to synthesize multiple different molecules with antibacterial activity. To this date, in this genus, a total of 69 antibacterial molecules, belonging to 18 different families have been identified, although numerous active compounds still remain uncharacterized (Offret et al. 2016). The analysis of the genome of NC201 has in particular highlighted the presence of two genes coding for antimicrobial molecules, belonging to LodA family (lysine oxidase) *via* the H_2O_2 production. In both genes, an adjacent gene, *lodB*, was located.

Indeed, in the NC201 chromosome, the LodA-like sequence was identical to 98.9% and 24% to two sequences found in *P. flavipulchra JG1,* a LodA-like and PfaP, respectively (Yu et al. 2012b). A second sequence found in the NC201 chromid, was identical to 99% to the PfaP protein sequence in *P. flavipulchra* JG1. PfaP is identical to 58% to the AlpP sequence found in *P. tunicata* D2 (James et al. 1996; Yu et al. 2012b). Moreover in the marine bacterium *P. flavipulchra* C2 an antimicrobial protein is related to L-Lysine oxidase AlpP (Chen et al. 2010a). *Marinomonas mediterranea*, species, originally included in the genus *Alteromonas* like the genus *Pseudoalteromonas,* also synthetizes an antimicrobial protein, marinocine, which gene has been named *lodA* for L-lysine epsilon-oxidase (52% of identity to AlpP of *P. tunicata*) (Lucas-Elío et al. 2006). This gene forms part of an operon with a second gene, *lodB* that codes for a putative dehydrogenase flavoprotein (Lucas-Elío et al. 2006; Gómez et al. 2010). The expression of the lysine-epsilon-oxidase activity requires functional copies of both gene (*lodA* and *lodB*). The *lodB* gene is necessary for LodA protein to show its oxidase activity, and the authors have demonstrated that *lodB* is involved in the synthesis of the quinonic cofactor needed for LodA (Gómez et al. 2010). At this point it is interestingly to note that neither LodA nor LodB show any extracellular export signal. Formation of cofactor (LodB) and LodA activation is achieved in the bacterial cell. However LodA is a secreted protein and its activity is mainly detected in external medium during the stationary phase of growth (Gómez et al. 2010). The authors suggest that the LodA responsible for the hydrogen peroxide production is released in the environment during cell death of part of the population (cellular lysis). This could explain why older bacterial cultures supernatants of NC201 showed an increase in antibacterial activity, as the bacteria start to starve due to nutrient depletion. The lysine oxidases synthesized in microorganisms have various molecular weights, 60 kDa to 190 kDa containing subunits or not (James et al. 1996; Lucas-Elío et al. 2005; Gómez et al. 2008; Chen et al. 2010b; Yu et al. 2012b) and are in accordance to the molecular weights expected for the LodA-NC201 (72.5 and 76.9kDa). Concerning the NC201 LodB, the molecular weight (40kDa) is consistent with that of the intracellular LodB (around 45 kDa) of *M. mediterranea* (Gómez et al. 2010). Thus, based on the sequence homologies, similar hypothetical proteins, and also on the structural identity, the lysine oxidases found in NC201 could code for lysine-epsilon-oxidase proteins. The same organization of two adjacent genes (*lodA* and *lodB*) supports the hypothesis of a similar interaction between the corresponding proteins (Gómez et al. 2010).

The comparison of *in silico* LodA-NC201 tryptic digestion results with the products of an experimental tryptic digestion of the NC201 active protein (65-70 kDa in SDS-PAGE), showed 24 detected masses matching predicted masses (Table 3). The fragments corresponding to those masses covered 80% of the chromosome LodA-like protein. Number of fragment and sequence coverage was enough to confirm this protein identity (Yeh et al. 2013). The number of matching fragments dropped to 10 when compared to the chromid LodA protein for coverage of 69%. While only 10 matching fragments are not enough to confirm the identity of the protein, the coverage above 50% can be considered very high. Despite 24% of identity between both potential proteins found in NC201 genome, the theoretical fragments obtained

after a complete trypsin digestion of the chromosome LodA-like and chromid LodA proteins do not match. It is therefore not surprising that the identified fragments do not match both proteins simultaneously either, with the exception of 2 fragments at 3,262 and 3,174 Da, both resulting from an incomplete digestion for both proteins. Thus, in NC201, the enzyme most likely to be responsible for the measured antimicrobial activity is the LodA-like located in the chromosome. A slight contamination of the excised band with the closely related LodA protein of the chromid cannot be discarded since molecular weights have only 5 kDa of difference and trace amounts might have been excised alongside the active band. The high amount of missed cleavage sites can be explained by both a poor efficiency during the digestion but also by the relatively high lower detection range limit, most fragments resulting from a complete trypsic digestion ranging from 500 to 2,000 Da and thus being below the 2,000 Da detection limit. These results suggest that the NC201 chromid protein identical to 99% with the PfaP found in *P. flavipulchra* JG1 is not likely the source of the amino acid oxidase linked antibacterial activity which would result from the protein LodA-like identified on chromosome, only identical to 24% to PfaP (Yu et al. 2012b).

Yu et al. (2012b) estimated the PfaP size to 70 kDa following the SDS-PAGE and showed the large antimicrobial activity of this enzyme against *Vibrio* genus. In NC201, LodA around 65-70 kDa led to the inhibition of *Vibrio alginolyticus,* probably *via* the production of peroxide hydrogen. These results suggest also that antimicrobial protein identified from NC201 culture supernatant is excreted as described for the LodA family (Gómez et al. 2010). Several *Pseudoalteromonas* strains also displayed an indirect antimicrobial activity through the synthesis and release of amino acid oxidases which by producing hydrogen peroxide have an antibacterial activity (Lucas-Elío et al. 2006; Mai-Prochnow et al. 2008; Chen et al. 2010a; Yu et al. 2012b). The first link between antibacterial activity and the synthesis of hydrogen peroxide was described by Lucas-Elío et al. (2006) in *Marinomonas mediterranea* even if similar gene had already been identified in *P. tunicata* (Rao et al. 2005). The antimicrobial properties of enzymes generating hydrogen peroxide have also been described in other bacteria and in fact this is one of the mechanisms used by lactic bacteria to control the growth of competitors (Lindgren 1990; Sobrino et al. 1991). Mai-Prochnow et al. (2008) showed that AlpP acts as a lysine oxidase and that hydrogen peroxide generated is responsible for cell death within microcolonies during biofilm development in both *M. mediterranea* and *P. tunicata.* Thus, in natural environments this LodA mediated biofilm differentiation and played a role in microbial competition or in biofilm development. In order to explore whether the similar LodA found from NC201 culture supernatant plays a same role, some experiments to study its physiological role and enzyme characterization should be investigated.

The antimicrobial activity of LodA-NC201 proteins were detected by denaturing SDS-PAGE but the samples were not heat treated. When non-denaturing conditions and heat treatment were used no activity was observed (results not shown). These results suggested that LodA-NC201 proteins could resist to SDS treatment but not to heat treatment, and so conserve its structure. In addition, the heat treatment of the culture supernatant fraction above 50 kDA containing LodA-NC201 showed a relative sensitivity. In fact from 28°C, an activity loss was noted, with a complete loss at 60°C. This sensitivity was also shown with the proteinase K treatment. Thus, these antimicrobial proteins from NC201 appeared more sensitive than AlpP and marinocine in *P. tunicata* and *M. mediterranea* (James et al. 1996; Lucas-Elío et al. 2005) but a similar heat sensitivity was observed for PfaP in *P. flavipulchra* JG1 (Yu et al. 2012b).

The antimicrobial activity observed with the fraction above 50kDa was variable but it was noteworthy highest against a *V. alginolyticus* isolated from shrimp hatchery. The antimicrobial

proteins secreted by the *Pseudoalteromonas* and *Marinomonas* can inhibit various bacteria species from several genus but not only bacteria from aquatic environment (Yu et al. 2012b). Thus, the proteins from NC201 *Pseudoalteromonas* could also have a more extended antimicrobial activity, participing in the regulation of bacterial flora in environment and in animal.

In addition, the NC201 genome analysis revealed the presence of main categories covering the antibacterial metabolites, alkaloids, polyketids, non-ribosomally synthesized proteins (NRPS) and bacteriocins. *In silico* search, using AntiSMASH (antibiotic and secondary metabolite analysis shell) for short antibacterial molecules, have revealed numerous clusters of interest. Most clusters identified in NC201 genome are coding for peptides of the tyrothricin peptide mix, which is composed by gramicidin and tyrocidin (Dubos and Hotchkiss 1940). These peptides have an antibacterial activity against Gram positive and Gram negative bacterial through formation of pores in the bacterial cell membrane and are considered as the first antibiotics to have been commercialized. Another type of antibiotics found through this analysis is a cluster coding for a lanthibiotic. A cluster displaying a structure similar to a bacteriocin operon was also identified, however, none of the proteins encoded in this cluster did match known sequences. These results are consistent with the high antibacterial potential found in the genomes of pigmented *Pseudoalteromonas* species. Based on morphologic observations, with bright yellow colonies NC201 should belong to the clade described by Bosi et al. (2017), regrouping the pigmented *Pseudoalteromonas* strains. This group showed a high number of antibacterial and secondary metabolite coding sequences. All these potential antibacterial peptides and secondary metabolites are relatively small molecules and could account for the antibacterial activity observed in the NC201 supernatant fractions below 10 kDa. Indeed gramicidin and tyrocidin are short peptides of 15 amino acids with a molecular weight of 1.88 and 1.27 kDa, respectively. In a monomeric form they could take part in the antibacterial activity observed below 3kDa, but since they can also exist combined in dimeric forms, they might be retained between the 10 and 3 kDa cutoffs in their dimer conformations. These fraction activities also revealed resistant to incubation at 90°C during 1 h and enzymatic proteolysis, this concurs with the properties of gramicidin, which remains active in these conditions (Dubos 1939). Besides NRPS, the *Pseudoalteromonas* genus is also known to synthesize polyketides and alkaloids that might have antimicrobial activities. Polyketids are regrouping molecules formed by the condensation of ketids, which includes famous antibiotics such as erythromycin. The polyketids are also a diverse family, some can be associated with short peptides and form hybrid molecules with NRPS like polyketide synthases (Offret et al. 2016). The only polyketide synthase (PKS) structures found in the genome were associated with NRPS structures and therefore are linked to the gramicidin/tyrocidin synthesis. No explicit PKS sequence was identified. Another source of antibacterial activity in *Pseudoalteromonas* is alkaloids. The alkaloids found in *Pseudoalteromonas* are generally halogenated heterocycles, more specifically brominated cycles (Longeon et al. 2005; Offret et al. 2016). The *P. flavipulchra* strain JG1, which is genetically very close to NC201, synthesizes small bromated compounds, which contribute to the antibacterial activity of the strain (Yu et al. 2012b). Unfortunately the genomic sequence responsible for its biosynthesis is not known and can therefore not be identified on the genome. Other small molecules could also be responsible for the activity in the fraction below 3kDa, however no sequence was identified in the NC201 genome. A similar situation affects antibacterial alkaloids synthesized by *Pseudoalteromonas*, for instance tambjamine, a yellow pigment synthesized by *P. tunicata*, is known to be responsible for antibacterial activity measured in sponges (Rasmussen et al.

1993; Franks et al. 2005). Unfortunately no gene has been yet linked to the synthesis of these compounds either, they can only be identified through a direct characterization of their molecular structure. As shown with the macromolecules present in the NC01 culture supernatant (fraction above 50 kDa), the molecules below 10 kDa had an antimicrobial activity against the same *Vibrio*. However this activity was less intense although various according to the species of *Vibrio*. Contrary to the macromolecules, these small compounds seem very stable against heat treatments, no inactivation was observed after heat treatment at 95°C for 2 h. Further and deeper investigations would be performed to understand the function and role of these small molecules in the antimicrobial activity, and their potential synergistic interaction with the macromolecules in NC201.

To sum up, this study is mainly focused on the characterization of the strain NC201 and its antibacterial potential against *Vibrio* species, main pathogens in shrimp farms. Through the genomic analysis, *Pseudoalteromonas* NC201 was classed closer of *P. flavipulchra* JG1, and could constitute a sub-species of *P. piscicida*. A broad-spectrum antibacterial activity was shown as in the other species of pigmented *Pseudoalteromonas*. This antimicrobial activity, resulting of macromolecules such LodA and potentially of small molecules, could be involved in the ability of NC201 to act as probiotic by its impact on microflora in host and environment. Investigations are under way in order to study the impact of NC201 on the microbiota composition and regulation in farmed shrimp and particularly on pathogen *Vibrio*.

Acknowledgements

This work was partly supported by the Provincial Institutions (Province Sud, Province Nord et Province des Iles Loyauté) and the Government of New Caledonia. Thanks are due to Marcus Persicke and Tobias Busche (CeBiTec, Bielefeld University), Antheaume Cyril, Valérie Médevielle et Amandine Rey, (University of New-Caledonia), Dominique Ansquer and Cécile Irvoas (Ifremer) for their technical assistance and support. Any opinions, findings, and conclusions or recommendations expressed in this material are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the supporting bodies mentioned herein.

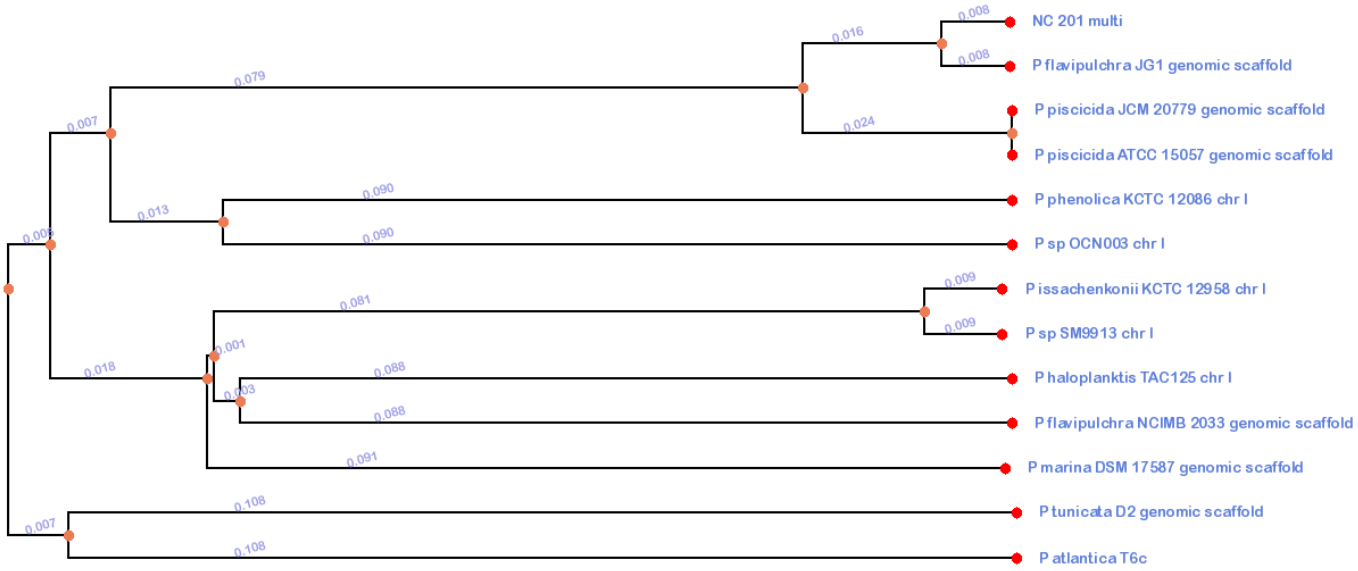


Figure 1: Phylogenic tree of the *Pseudoalteromonas* genus based on average nucleotide identity score matrix (ANI).

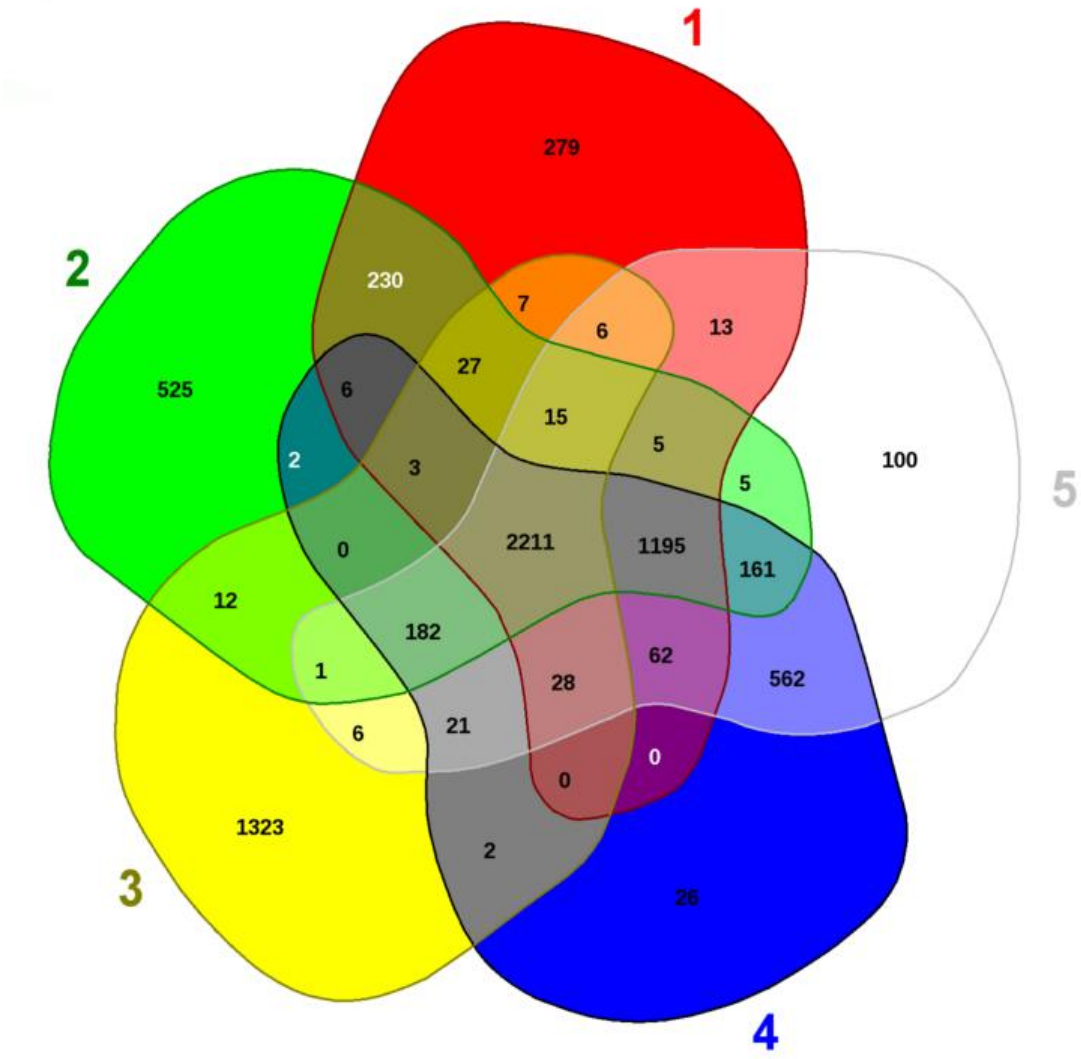


Figure 2: Gene repartition for five *Pseudoalteromonas* strains, 1) *P*. NC201, 2) *P. flavipulchra* JG1, 3) *P. flavipulchra* NCIMB2033, 4) *P. piscicida* ATCC15057 and 5) *P. piscicida* JCM20779 genomes.

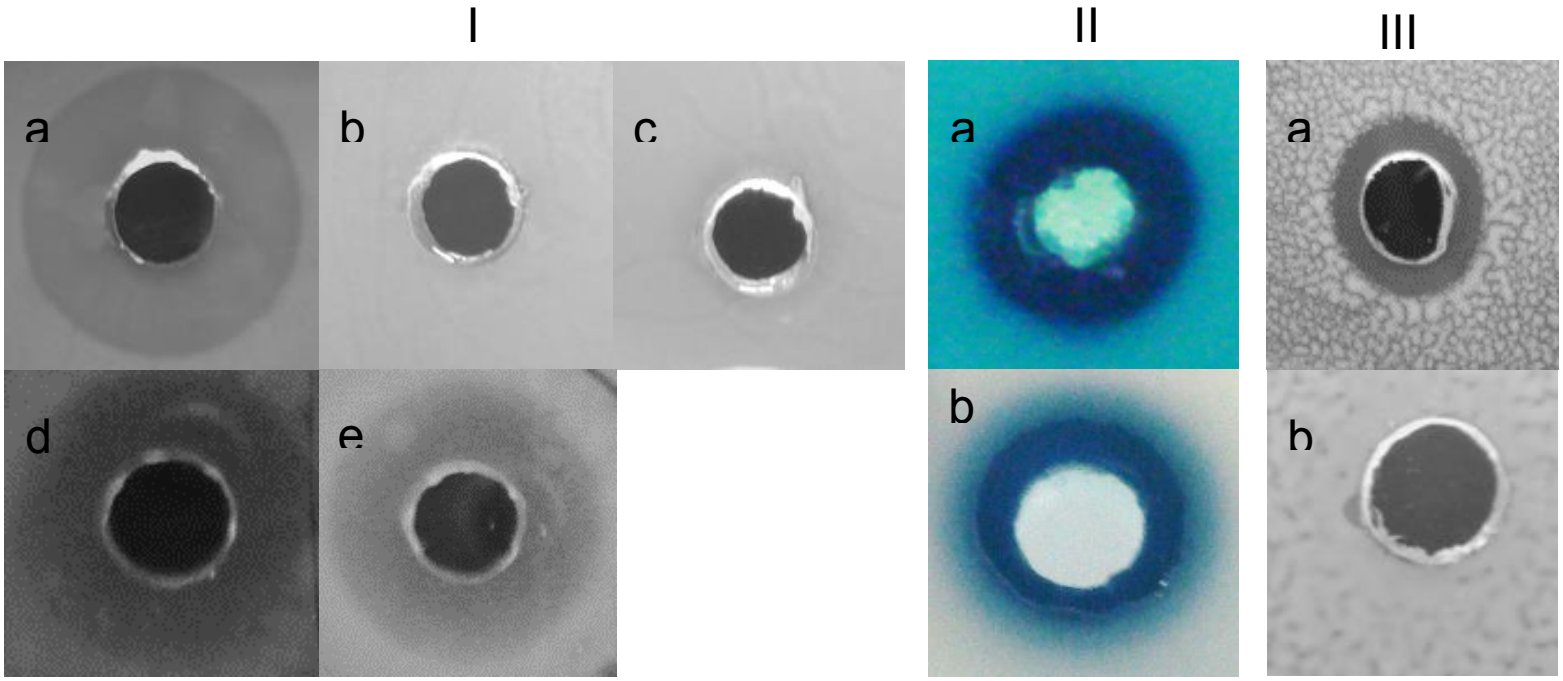


Figure 3: I Antibacterial activity of NC201 fractionated supernatant against *V. alginolyticus*, a) fraction above 50 kDa, b) fraction between 50-30 kDa, c) fraction between 30-10 kDa, d) fraction between 10-3 kDa e) fraction below 3kDa (flow through). **II** Oxidase activity**:** fraction above 50 kDa producing of hydrogen peroxide (H_2O_2) shown on TSA with Prussian blue precursor, the presence of a blue halo marks H_2O_2 production a) without bacteria, b) with *V. alginolyticus,* the blue halo, due to H_2O_2 production, coinciding with limit of the inhibition halo. **III** Antibacterial activity of the fraction above 50 kDa heated for 1 h: a) at 50°C, b) at 60°C

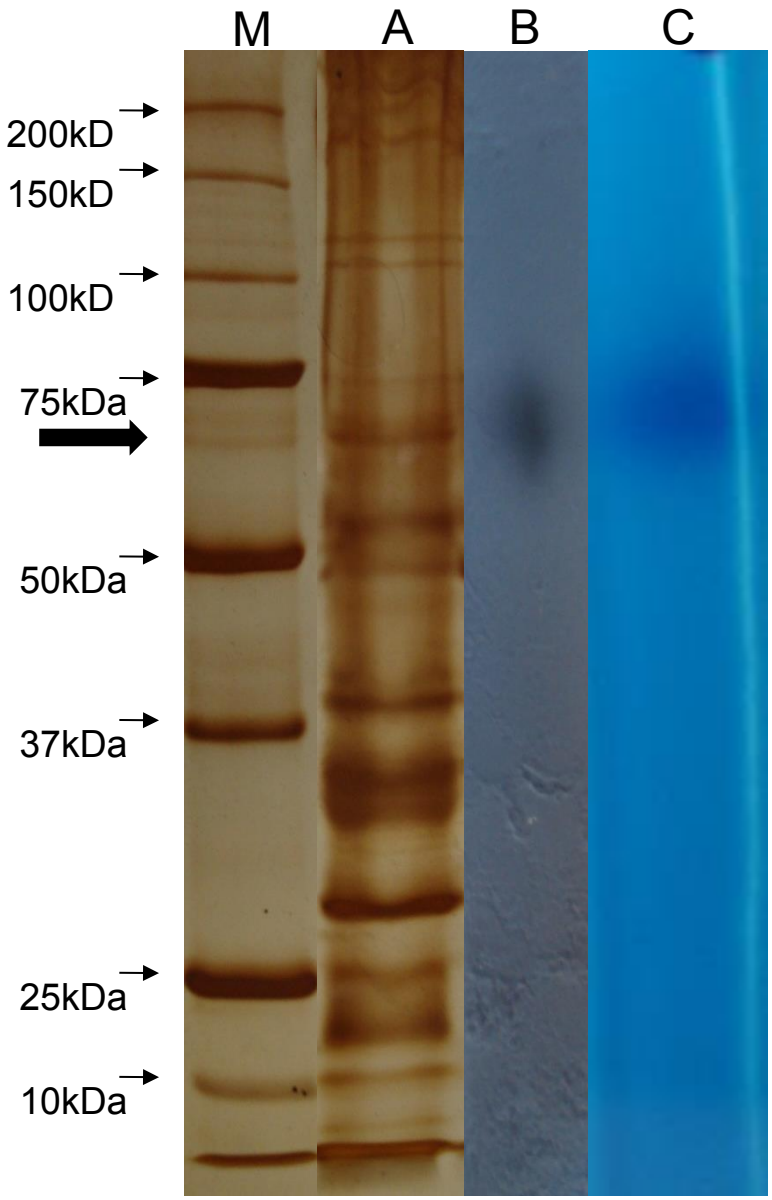


Figure 4: SDS-PAGE of the fraction above 50 kDa obtained by filtration of NC201 supernatant: A) stained with silver nitrate, B) tested for inhibition of *V. alginolyticus* OTC^R in overlay assay C) tested for hydrogen peroxide production by depositing it on plate containing the TSA-Prussian blue precursor medium agar. Protein band with an inhibition activity on *V. alginoliticus* is indicated by the black arrow (65 kDa). M) Molecular weight ladder (Unstained Precision Plus Protein™ Standards, BioRad) stained with silver nitrate.

Table 1: Biosynthetic operons involved in the potential biosynthesis of secondary metabolites in *Pseudoalteromonas* NC201, identified by AntiSMASH.

Chromosome					
cluster number	structure	Strains showing similar gene cluster	Homology percentage	Synteny	biosynthetic genes
1	NRPS-T1PKS	*Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1	95%	respected	NRPS T1PKS (x2) linear gramicidin subunit B and D gramicidin S tyrocidin synthase 3
2	NRPS-T1PKS	*Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1	78%	respected	T1PKS tyrocidine synthase 3 (x5) linear gramicidin subunit D (x5)
3	NRPS-Arylpolyene	*Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779 *Pseudoalteromonas elyakovii* strain ATCC 700519 *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1	97% 44% 47%	respected respected respected	linear gramicidin subunit D (x2) plipastatine B gramicidine deshydrogenase E
4	Bacteriocin	*Pseudoalteromonas* sp. NJ631 *Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779 *Pseudoalteromonas rubra* ATCC 29570 *Pseudoalteromonas citrea* NCIMB 1889	30% 33% 30% 30%	respected respected respected respected	hypothetical protein
5	NRPS-T1PKS	*Pseudoalteromonas elyakovii* strain ATCC 700519 *Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779 *Pseudoalteromonas* sp. NJ631	61% 61% 61%	respected respected respected	PKS carotenoid gramicidin dehydrogenase E
6	NRPS-T1PKS	*Pseudoalteromonas* sp. NJ631 *Pseudoalteromonas elyakovii* strain ATCC 700519 *Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779	86% 84% 91%	respected respected mostly respected	biotin linear gramicidin subunit D tyrocidin synthase 3
7	NRPS	*Pseudoalteromonas elyakovii* strain ATCC 700519 *Pseudoalteromonas* sp. NJ631 *Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779	95% 93% 91%	respected respected respected	NRPS tyrocidine synthase 3 plipastatine B
8	Lantipeptide	*Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779	76%	respected	Lanthionin synthetase C

Chromid					
cluster number	structure	Strains showing similar gene cluster	Homology percentage	Synteny	biosynthetic genes
1	NRPS	*Methylophaga* sp. JAM7 *Pseudomonas aeruginosa* 19660	51% 41%	respected not respected	gramicidin dehydrogenase E tyrocidin synthase 3 Phenyloxazoline synthase MbtB
2	Bacteriocin	*Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1 *Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779 *Pseudoalteromonas* sp. NJ631	34% 34% 27%	respected respected respected	hypothetical protein
3	Bacteriocin	*Pseudoalteromonas elyakovii* strain ATCC 700519 *Pseudoalteromonas* sp. NJ631	27% 27%	respected respected	extracellular serine protease precursor hypothetical protein

Table 2: Culture conditions and biochemical needs of NC201, different molecules usable as a carbon source by NC201, and chemical resistances of the *Pseudoalteromonas* NC201 strain at 28°C (Biolog assay GenIII plate and IF-B medium).

Carbon source	A	B	Carbon source	A	B	Chemical sensitivities	A	B
Control negatif	-	-	Gelatin	-	-	Positive control	+	+
Dextrin	-	+	Glycyl-L-proline	+	+	pH 6	+	+
D-maltose	-	-	L-alanine	-	+/-	pH 5	-	-
D-trehalose	-	+	L-arginine	+/-	-	1% NaCl	+	+
D-cellobiose	-	-	L-aspartic acid	-	+/-	4% NaCl	+	+
Gentiobiose	-	-	L-glutamic acid	-	+/-	8% NaCl	+	+
Sucrose	+	+	L-histidine	-	-	1% Sodium lactate	+	+
D-turanose	+	+	L-pyroglutamic acid	-	+	Fusidic acid	+	+
Stachyose	+	+	L-serine	+	+	D-serine	+	+
D-Raffinose	-	+	Pectin	-	-	Troleandomycin	-	-
a-D-lactose	+/-	+	D-galacturonic acid	+/-	-	Rifamicyn sv	-	-
D-melibiose	+	+	L-galactonic acid lactone	-	-	Minocycline	-	-
b-Methyl-D-glucoside	-	-	D-gluconic acid	+/-	-	Linconmycine	+	+
D-salicin	+	+	D-glucuronic acid	+/-	+/-	Guanidine HCl	-	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	-	Glucuronamide	+/-	+	Naproof4	-	-
N-acetyl-b-D-mannosamine	-	+	Mucic acid	-	-	Vancomycin	-	-
N-acetyl-D-galactosamine	-	+	Quinic acid	-	-	Tetrazollum violet	-	-
N-acetyl-neuraminic acid	-	-	D-saccharic acid	-	-	Tetrazollum blue	+	+
a-D-glucose	+	+	p-Hydroxy-phenylacetic acid	+	+	Nalidixic acid	-	-
D-mannose	-	+	Methyl pyruvate	-	-	Lithium chloride	-	-
D-fructose	-	+	D-lactic acid methyl ether	-	-	Potassium tellurite	-	-
D-galactose	+	+	L-lactic acid	-	+/-	Aztreonam	+	+
3-methyl glucose	+	+	Citric acid	-	-	Sodium butyrate	+	+
D-fucose	+	+	a-Keto-glutaric acid	-	-	Sodium bromate	+	+
L-fucose	+	+	D-malic acid	-	-			
L-Rhamnose	+	+	L-malic acid	-	-			
Inosine	-	-	Bromo-succinic acid	-	-			
D-sorbitol	+	+	Tween 40	-	-			
D-mannitol	+	+	y-Amino-butyric acid	+/-	-			
D-arabitol	-	-	a-Hydroxy-butyric acid	+	+			
myo-inositol	-	+	b-Hydroxy-D,L-butyric acid	+	+			
Glycerol	+	+	a-Keto-butyric acid	-	-			
D-glucose-6-PO4	-	-	Acetoacetic acid	-	-			
D-fructose-6-PO4	-	-	Propionic acid	+	+			
D-aspartic acid	+	-	Acetic acid	-	+			
D-serine	+	-	Formic acid	+	+			

Table 3: Chromosome LodA-like protein fragments after trypsic digestion. Theoretical masses (Mt) matched to experimental masses (Me) measured through MALDI-TOF.

Position	Missed cleavage sites	Mt	Me	Peptide sequence
44-63	4	2419.2047	2419.765	DMNYYRDSTGALKRQAARFR
58-75	2	2021.0926	2022.955	QAARFRIYGLDAEGNIVK
62-90	2	3262.6313	3263.287	FRIYGLDAEGNIVKELTCDD GASIIWHAR
62-119	4	6577.2958	6576.430	FRIYGLDAEGNIVKELTCDD GASIIWHARLANQKASWYEF QLALDIPEAMEAEPSLLR
76-126	3	5826.8642	5827.871	ELTCDDGASIIWHARLANQK ASWYEFQLALDIPEAMEAEP SLLRNLNVNDR
120-149	1	3032.4636	3029.493	NLNVNDRNSLLIDGGAQQIS GIASGCGCSR
127-158	2	3174.5128	3173.944	NSLLIDGGAQQISGIASGCG CSRFEGCFAGKK
213-240	2	3129.6012	3129.763	YQGKALDVKPAWVICAPPDY APMQKSPR
213-267	5	6112.1107	6112.295	YQGKALDVKPAWVICAPPDY APMQKSPRTMWDLMRQVAVD AKILPAPEGNPSFSK
248-306	3	6568.2862	6570.101	QVAVDAKILPAPEGNPSFSK DILPIFQRLTDLQWVNAGFA AGFGWNSPFDFTSETWICR
255-306	2	5856.8947	5857.962	ILPAPEGNPSFSKDILPIFQ RLTDLQWVNAGFAAGFGWNS PFDFTSETWICR
268-319	4	6145.9942	6144.921	DILPIFQRLTDLQWVNAGFA AGFGWNSPFDFTSETWICRL NDNSRTWQEARR
276-306	0	3536.6368	3536.578	LTDLQWVNAGFAAGFGWNSP FDFTSETWICR
276-330	5	6567.1652	6566.014	LTDLQWVNAGFAAGFGWNSP FDFTSETWICRLNDNSRTWQ EARRNLFNNFRQIEK
319-343	4	3073.5602	3073.988	RNLFNNFRQIEKVTTADEKH SWDPK
327-343	2	2012.0083	2013.287	QIEKVTTADEKHSWDPK
483-524	2	4762.2241	4762.624	TGQVAGGITRWMAIPWQTDT ASCRDGYNEAYDPYLPTFWP AR
493-548	3	6704.1033	6703.309	WMAIPWQTDTASCRDGYNEA YDPYLPTFWPARVPNNMLSE QNYHRVVDETRPFAER
525-548	1	2901.4060	2902.998	VPNNMLSEQNYHRVVDETRP FAER
538-590	2	5973.0643	5973.840	VVDETRPFAERQAAFNDREL WLNDLPIGPSTNYIEQINSM ITGFGQLAVVLPK
556-610	2	5943.1325	5942.107	ELWLNDLPIGPSTNYIEQIN SMITGFGQLAVVLPKTEKGV TGFPTTMQVGLTPVK
594-614	1	2184.1481	2185.983	GVTGFPTTMQVGLTPVKADH K
618-643	4	3056.5225	3056.960	LLTASRNESMRDCRPDLSQT DKAHRR
624-642	2	2259.0353	2258.825	NESMRDCRPDLSQTDKAHR

References

Akther N, Wu B, Memon AM, Mohsin M (2015) Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. Fish Shellfish Immunol 45:733–741. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.038

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Nucleic Acids Res 40:W597–W603. doi: 10.1093/nar/gks400

Bajagai YS, Klieve A V., Dart PJ, Bryden WL (2016) Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation.

Blin K, Medema MH, Kazempour D, et al (2013) antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. Nucleic Acids Res 41:W204–W212. doi: 10.1093/nar/gkt449

Blom J, Albaum SP, Doppmeier D, et al (2009) EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. BMC Bioinformatics 10:154. doi: 10.1186/1471-2105-10-154

Bosi E, Fondi M, Orlandini V, et al (2017) The pangenome of (Antarctic) *Pseudoalteromonas* bacteria: evolutionary and functional insights. BMC Genomics 18:93. doi: 10.1186/s12864-016-3382-y

Campillo-Brocal JC, Lucas-Elío P, Sanchez-Amat A (2015) Distribution in different organisms of amino acid oxidases with fad or a quinone as cofactor and their role as antimicrobial proteins in marine bacteria. Mar Drugs 13:7403–7418. doi: 10.3390/md13127073

Chacón-Verdú MD, Gómez D, Solano F, et al (2014) LodB is required for the recombinant synthesis of the quinoprotein l-lysine-??-oxidase from *Marinomonas mediterranea*. Appl Microbiol Biotechnol 98:2981–2989. doi: 10.1007/s00253-013-5168-3

Chalkiadakis E, Dufourcq R, Schmitt S, et al (2013) Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *vibrio neocaledonicus* sp. nov., from new caledonia. J Appl Microbiol 114:1702–1712. doi: 10.1111/jam.12184

Chen WM, Lin CY, Chen CA, et al (2010a) Involvement of an l-amino acid oxidase in the activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas flavipulchra* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Enzyme Microb Technol 47:52–58. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.03.008

Chen WM, Lin CY, Sheu SY (2010b) Investigating antimicrobial activity in *Rheinheimera* sp. due to hydrogen peroxide generated by l-lysine oxidase activity. Enzyme Microb Technol 46:487–493. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.01.006

Costa R, Mermoud I, Koblavi S, et al (1998) Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. Aquaculture 164:297–309. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00195-1

Cserzo M, Eisenhaber F, Eisenhaber B, Simon I (2002) On filtering false positive transmembrane protein predictions. Protein Eng Des Sel 15:745–752. doi: 10.1093/protein/15.9.745

Defer D, Desriac F, Henry J, et al (2013) Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: the bacterial connection. Fish Shellfish Immunol 34:1439–47. doi: 10.1016/j.fsi.2013.03.357

Dheilly A, Soum-Soutéra E, Klein GL, et al (2010) Antibiofilm activity of the marine bacterium *pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. Appl Environ Microbiol 76:3452–3461. doi: 10.1128/AEM.02632-09

Dubos RJ (1939) Studies on a bacterial agent extracted from soil *Bacillus*. J Exp Med 70:1–10. doi: 10.1084/jem.70.1.1

Dubos RJ, Hotchkiss RD (1940) Bactericidal fractions from an aerobic sporulating *bacillus*. J Biol Chem 28:803–804. doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.02971.x

Dufourcq R, Chalkiadakis E, Fauchon M, et al (2014) Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine costal environment from New Caledonia. Lett Appl Microbiol 58:102–8. doi: 10.1111/lam.12162

Franks A, Egan S, Holmström C, et al (2006) Inhibition of fungal colonization by *Pseudoalteromonas tunicata* provides a competitive advantage during surface colonization. Appl Environ Microbiol 72:6079–6087. doi: 10.1128/AEM.00559-06

Franks A, Haywood P, Holmström C, et al (2005) Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *pseudoalteromonas tunicata*. In: Molecules. pp 1286–1291

Gauthier G, Gauthier M, Christen R (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of tw. Int J Syst Bacteriol 45:755–761. doi: 10.1099/00207713-45-4-755

Goarant C, Régnier F, Brizard R, Marteau AL (1998) Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. Aquaculture 169:291–296. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00380-9

Gómez D, Espinosa E, Bertazzo M, et al (2008) The macromolecule with antimicrobial activity synthesized by *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strains is an L-amino acid oxidase. Appl Microbiol Biotechnol 79:925–930. doi: 10.1007/s00253-008-1499-x

Gómez D, Lucas-Elío P, Sanchez-Amat A, Solano F (2006) A novel type of lysine oxidase: l-lysine-6-oxidase. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics 1764:1577–1585. doi: 10.1016/j.bbapap.2006.08.014

Gómez D, Lucas-Elío P, Solano F, Sanchez-Amat A (2010) Both genes in the *Marinomonas mediterranea* lodAB operon are required for the expression of the antimicrobial protein lysine oxidase. Mol Microbiol 75:462–473. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07000.x

Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, et al (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int J Syst Evol Microbiol 57:81–91. doi: 10.1099/ijs.0.64483-0

Hai N V. (2015) The use of probiotics in aquaculture. J Appl Microbiol 119:917–935. doi: 10.1111/jam.12886

Hai N Van, Buller N, Fotedar R (2009) The use of customised probiotics in the cultivation of western king prawns (Penaeus latisulcatus Kishinouye, 1896). Fish Shellfish Immunol 27:100–4. doi: 10.1016/j.fsi.2009.05.004

Holmström C, Kjelleberg S (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microb Ecol 30:285–293. doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00656.x

Holmström C, Mccloy S (2002) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species.

Husemann P, Stoye J (2009) r2cat: Synteny plots and comparative assembly. Bioinformatics 26:570–571. doi: 10.1093/bioinformatics/btp690

Hyatt D, Chen G-L, Locascio PF, et al (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC Bioinformatics 11:119. doi: 10.1186/1471-2105-11-119

Hyatt D, Locascio PF, Hauser LJ, Uberbacher EC (2012) Gene and translation initiation site prediction in metagenomic sequences. Bioinformatics 28:2223–2230. doi:

10.1093/bioinformatics/bts429
Irianto A, Austin B (2002) Probiotics in aquaculture. J Fish Dis 25:633–642. doi: 10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x
James SG, Holmström C, Kjelleberg S (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. Appl Environ Microbiol 62:2783–2788.
Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. J Clin Microbiol 45:2761–2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07
Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protoc 10:845–858.
Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L (2008) Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture 274:1–14.
Kinter M, Sherman NE (2000) Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA
Laemmli UK (1970): (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. Nature 227:680–685. doi: 10.1038/227680a0
Lindgren S (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol Lett 87:149–163. doi: 10.1016/0378-1097(90)90703-S
Longeon A, Peduzzi J, Barthélemy M, et al (2005) Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. Mar Biotechnol (NY) 6:633–41. doi: 10.1007/s10126-004-3009-1
Lucas-Elío P, Gómez D, Solano F, Sanchez-Amat A (2006) The antimicrobial activity of marinocine, synthesized by *Marinomonas mediterranea*, is due to hydrogen peroxide generated by its lysine oxidase activity. J Bacteriol 188:2493–2501. doi: 10.1128/JB.188.7.2493-2501.2006
Lucas-Elío P, Hernandez P, Sanchez-Amat A, Solano F (2005) Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 1721:193–203. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.11.002
Mai-Prochnow A, Evans F, Dalisay-Saludes D, et al (2004) Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Appl Environ Microbiol 70:3232–3238. doi: 10.1128/AEM.70.6.3232
Mai-Prochnow A, Lucas-Elio P, Egan S, et al (2008) Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. J Bacteriol 190:5493–5501. doi: 10.1128/JB.00549-08
Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, et al (2005) CDD: A Conserved Domain Database for protein classification. Nucleic Acids Res 33:192–196. doi: 10.1093/nar/gki069
Medema MH, Blin K, Cimermancic P, et al (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. Nucleic Acids Res 39:W339–W346. doi: 10.1093/nar/gkr466
Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 14:60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60
Mermoud I, Costa R, Ferré O, et al (1998) “Syndrome 93” in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: History and description of three major outbreaks.

Aquaculture 164:323–335. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00197-5

Mohapatra S, Chakraborty T, Kumar V, et al (2013) Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 97:405–430. doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x

Offret C, Desriac F, Le Chevalier P, et al (2016) Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and ecological significance. Mar Drugs. doi: 10.3390/md14070129

Okazaki S, Nakano S, Matsui D, et al (2013) X-Ray crystallographic evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in l-lysine ε-oxidase from *Marinomonas mediterranea*. J Biochem 154:233–236. doi: 10.1093/jb/mvt070

Penesyan A, Marshall-Jones Z, Holmstrom C, et al (2009) Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs: Research article. FEMS Microbiol Ecol 69:113–124. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00688.x

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Meth 8:785–786.

Pham D, Ansquer D, Chevalier A, et al (2014) Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. Aquaculture 432:475–482. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.04.031

Rao D, Webb JS, Kjelleberg S (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Appl Environ Microbiol 71:1729–1736. doi: 10.1128/AEM.71.4.1729-1736.2005

Rasmussen T, Jensen J, Anthoni U, et al (1993) Structure and synthesis of bromoindoles from the marine sponge *Pseudosuberites hyalinus*. J Nat Prod 56:1553–1558. doi: 10.1021/np50099a014

Sobrino OJ, Rodr??guez JM, Moreira WL, et al (1991) Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from dry fermented sausages. Int J Food Microbiol 13:1–10. doi: 10.1016/0168-1605(91)90130-H

Walker JM (2002) The Protein Protocols Handbook.

Weber T, Blin K, Duddela S, et al (2015) antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Res 43:W237–W243. doi: 10.1093/nar/gkv437

Yeh M-S, Tsai W-L, Cheng W (2013) Identification and cloning of the second type transglutaminase from Litopenaeus vannamei, and its transcription following pathogen infection and in relation to the haemolymph coagulation. Fish Shellfish Immunol 35:1613–23. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.002

Yu M, Tang K, Shi X, Zhang X-H (2012a) Genome sequence of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1, a marine antagonistic bacterium with abundant antimicrobial metabolites. J Bacteriol 194:3735. doi: 10.1128/JB.00598-12

Yu M, Wang J, Tang K, et al (2012b) Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. Microbiology 158:835–42. doi: 10.1099/mic.0.055970-0

Zeng V, Villanueva KE, Ewen-campen BS, et al (2011) De novo assembly and characterization of a maternal and developmental transcriptome for the emerging model crustacean *Parhyale hawaiensis De novo* assembly and characterization of a maternal and developmental transcriptome for the emerging model crustacean. BMC Genomics 12:581. doi: 10.1186/1471-2164-12-581

Partie 2 : Administration de NC201 chez *L. stylirostris* : effet probiotique sur la physiologie de la crevette suite à des stress biotique et abiotique

La 1ère partie de ce chapitre de résultats était entièrement consacrée à la bactérie NC201, analyse de son génome et les propriétés antibactériennes des molécules trouvées dans son surnageant de culture mettant en évidence son potentiel antimicrobien. Afin de mettre en évidence comment la souche NC201 joue son rôle probiotique chez *L. stylirostris* (Pham et al 2014), dans cette seconde partie du chapitre des résultats les recherches ont été focalisées l'impact du probiotique NC201 sur la physiologie de la crevette et plus particulièrement sur la réponse immunitaire et sur la réponse au stress oxydant. Pour révéler une potentielle amélioration de l'état de santé de l'animal acquise *via* le traitement au probiotique NC201, les travaux ont été réalisés à partir de crevettes soumises à des stress biotique et abiotique. La souche NC201 ayant montré une activité inhibitrice vis-à-vis de *Vibrio* pathogènes de *L. stylirostris*, aussi bien son surnageant que en co-culture, des animaux traités au probiotique NC201 depuis l'éclosion ont été soumis d'une part à des infections avec *Vibrio nigripulchritudo* et d'autre part à des stress salins. Dans le 1er point de cette 2ème partie de la thèse, l'impact de la souche NC201 a été étudié en évaluant l'amélioration globale de la physiologie de la crevette en prenant comme paramètre le taux de survie suite au stress par infection avec *V. nigripulchritudo* et par un choc hyper ou hyposalin. De plus, lors des infections, les suivis de la souche NC201 et du *V. nigripulchritudo* dans l'hémolymphe des crevettes ont été réalisés. Lors des stress salins, la pression osmotique de l'hémolymphe qui a été mesurée. Ces travaux ont conduit à la rédaction d'un article à soumettre après levée de la confidentialité de ces travaux. Dans le second point de cette partie, une attention particulière a été portée à l'infection et aux réponses physiologiques de *L. stylirostris,* en analysant des biomarqueurs de l'immunité et du stress oxydant. Un des modes d'action des probiotiques étant la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans cette réponse a été quantifiée. Liés de façon indirecte à la réponse immunitaire et témoignant d'un état de santé général de l'animal certains gènes et enzymes impliqués dans la balance pro/antioxydant dans la cellule ont également été étudiés. Ces travaux ont conduit à la rédaction d'un article (en préparation) et d'un complément de résultats qui devrait conduire à la rédaction d'un autre article.

Partie 2.1 : Impact de NC201 sur les paramètres physiologiques globaux de *L. stylirostris* lors de stress infectieux et salins

L'effet des probiotiques, s'il n'est pas visible en conditions optimales, peut être révélé par l'exposition des animaux hôtes à des conditions stressantes. Lors des travaux effectués dans le cadre de cette thèse, les animaux ont été exposés à deux types de stress : un stress biotique par infection avec *V*. *nigripulchritudo* et un stress abiotique par choc hyper et hypoosmotique. En amont de ces stress biotique et abiotique, la souche NC201 a été dénombrée dans l'hémolymphe des animaux. La bactérie NC201 représente ainsi 47% de la flore bactérienne observée dans l'hémolymphe 2 h post administration et baisse progressivement jusqu'à atteindre 22% 24 h post administration. Afin de confirmer l'identification des colonies de NC201 dénombrées, un outil d'identification rapide par MALDI-TOF a été utilisé. La comparaison du profil de NC201 avec ceux d'autres *Pseudoalteromonas* a permis de confirmer la phylogénie issue des analyses génomiques présentées dans la partie I.

Dans le cadre de l'application du stress biotique sur des animaux traités au probiotique, le probiotique NC201 et le pathogène *V. nigripulchritudo* ont été dénombrés dans l'hémolymphe. *V*. *nigripulchritudo* est ainsi capable d'envahir l'hémolymphe des animaux non traités au probiotique dès 4 h post infection, représentant alors 33% de la flore présente dans l'hémolymphe. Chez les animaux traités, cette invasion est retardée de 24 h. On observe également une diminution de NC201 dans l'hémolymphe qui passe de 15% de la flore totale de l'hémolymphe avant infection à 2% dès 4 h post infection. Chez les animaux témoins on observe une baisse plus progressive des 15% initiaux à 12% et 9% à 4 et 12 h, pour finir à 3% de la flore de l'hémolymphe au bout de 24 h.

Les mortalités ont été suivies lors des deux types de stress biotique et abiotique. L'ajout de probiotique a conduit à une baisse de la mortalité due à l'infection par *V*. *nigripulchritudo* de plus de 20 points, passant de 48% chez les animaux témoins à 24% chez les animaux traités avec le probiotique 144 h post infection. De plus la mortalité a été retardée de 24 h chez les animaux traités probiotique *vs* animaux non traités.

Une baisse des mortalités par le probiotique est également observée lors des stress hyper et hyposalins. Cet effet a été particulièrement visible lors d'un stress hyposalin à 3ppt chez des animaux subadultes lors duquel les mortalités, 26 heures post stress, ont baissé de 50 à 35% chez les animaux traités probiotique. La mesure de l'osmolalité de l'hémolymphe a permis de révéler que les animaux traités aux probiotiques tendent à réguler plus rapidement leur milieu intérieur.

L'impact bénéfique de NC201 sur la physiologie de *L*. *stylirostris* a été confirmé lors des deux types de stress auxquels les animaux ont été exposés. En effet les survies ont été significativement améliorées suite à l'administration de NC201. Dans le cadre de l'infection expérimentale il s'est avéré que NC201 est capable de coloniser de façon transitoire l'hémolymphe des animaux, le temps de présence de NC201 est cependant raccourci en présence de *V. nigripulchritudo*. Il est cependant intéressant de noter que dans ce cadre le pathogène aussi ne colonise pas l'hémolymphe aussi vite et aussi massivement qu'en absence de probiotique. Ce retard d'entrée du pathogène pourrait expliquer la retard de mortalité observé chez les animaux traités par rapport aux témoins. Une modulation de l'activité de la réponse immunitaire par NC201 pourrait également être la cause de ces survies améliorées. Afin de mettre en évidence une potentielle stimulation de l'immunité ou une amélioration générale de la physiologie chez les animaux traités au probiotique, des échantillons issus des animaux exposés au stress infectieux ont été prélevés pour l'analyse de paramètres

immunitaires et de réponse au stress infectieux. Les résultats de ces analyses font l'objet du point 2 de cette partie II.

Les travaux sont présentés dans la publication :

Publication 3 :
L. Sorieul, N. Wabete, D. Ansquer, J-R. Mailliez, M. Pallud, C. Zhang, M. Lindivat, V. Boulo, D. Pham « Survival improvement by the *Pseudoalteromonas sp.* NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress » (pour soumission à Aquaculture, après la levée de la confidentialité d'Ifremer)

Publication 3 : « Survival improvement by the *Pseudoalteromonas sp.* NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress »

Survival improvement by the *Pseudoalteromonas sp.* NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress

Louis Sorieul[1,2], Nelly Wabete[1], Dominique Ansquer[1], Jean-René Mailliez[1], Marie Pallud[1], Cong Zhang[1], Mathilde Lindivat[1], Viviane Boulo[1], Dominique Pham[1].

[1] Ifremer, UR Lagon, Environnement et Aquaculture Durable, 101 Promenade Roger Laroque, BP32078, 98897 Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France
[2] Université de la Nouvelle-Calédonie, Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement, BPR4, 98851 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie, France

Keywords: *Litopenaeus stylirostris*, *Pseudoalteromonas*, Probiotic, *Vibrio nigripulchritudo*, Osmotic stress, gene expression.

Article to submit to: Aquaculture

Abstract
This study aimed to investigate the potential protection of the probiotic NC201 strain against biotic and abiotic stresses in pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* which have received probiotic their whole live. Before exposure to stressful conditions, the presence of NC201 in shrimp hemolymph was investigated during a 24 hours time course. Results showed that NC201 invaded the shrimp hemolymph 2 hours following administration and completely disappeared at 48 hours. NC201 identification through morphotypical observation was confirmed by MALDI-TOF biotyping and results also indicated that NC201 and *Pseudoalteromonas piscicida* were closely related. A challenge by immersion on subadults was carried out using *Vibrio nigripulchritudo* at 10^5 cfu.ml^{-1}. Cumulative mortality was twofold lower in the treated group (24%) than in the control one (48%) 144 h post infection. The probiotic in the shrimp hemolymph was diminished in infectious conditions compared to non infectious ones and *V. nigripulchritudo* prevalence was simultaneously lowered in animals treated with NC201. The genes relative expression coding the lysozyme and the penaeidin 3 were evaluated 24 h post infection and the transcript numbers were lower in probiotic animals than in control animals for both genes. Hyposaline stress was also used to evaluate NC201 administration benefit on early juveniles and subadults. In both cases, animals showed an increased survival rate when treated with NC201, by 10 and 17.5% at 24 and 48 h post stress, respectively. Moreover, in subadults treated with probiotic, a better recovery of the plasmatic osmolality was observed. All these results confirmed that NC201 is a good candidate as probiotic in shrimp aquaculture.

Introduction

Stressful environmental conditions linked to pathogen presence can lead to disease outbreak in shrimp farming (Kautsky et al., 2000). These issues can be compensated by use of probiotics instead of antimicrobial drugs (Irianto and Austin, 2002; Verschuere et al., 2000). In the last

decade, the use of probiotics in aquaculture has become increasingly common (Aguirre-Guzmán, 2012; Carnevali et al., 2017; Zorriehzahra et al., 2016). Many works have been achieved on *Bacillus spp.* or *Lactobacillus spp*. probiotic effects (Castex et al., 2009; Luis-Villaseñor et al., 2011; Vieira et al., 2007; Zokaeifar et al., 2012) but more and more studies concern marine bacteria *Pseudoalteromonas*. This bacteria genus, specifically marine, is known for its ability to colonize marine animals (Carbone et al., 2010; Holmström, 1999; Holmström and Mccloy, 2002), such as sponges, and harbors an important amount of strains with high antibacterial potential (Ayé et al., 2015; Cavalcanti et al., 2008; Offret et al., 2016). Strains of *Pseudoalteromonas* have already been tested as potential probiotics in mollusks (Kesarcodi-Watson et al., 2012), fish (Leyton et al., 2017) and crustaceans (Morya et al., 2014). Probiotics are viable cell preparations providing a beneficial effect to the host according to the Food and Agriculture Organization and the World Health Organization (Akhter et al., 2015). Their modes of action and their beneficial effects have been studied in aquatic species, either freshwater species or marine ones (Balcázar et al., 2006; Dawood and Koshio, 2016; Lazado et al., 2015). Host protection against pathogens is one of the probiotic potential roles. Some works have demonstrated that aquatic animals survival rates were improved when probiotic was administrated before challenging with bacteria (Balcázar et al., 2007a; Maeda et al., 2013; Ramírez et al., 2017; Zhang et al., 2011), fungi (Goncalves et al., 2014; Perazzolo et al., 2011) or virus (Antony et al., 2011; Chai et al., 2016; Mohamed et al., 2017). To combat the invasion of pathogens, the innate immune system of shrimp is activated, and the immune response can be modulated by the administration of probiotics. Indeed, the immunomodulatory role of the probiotics was observed in kuruma shrimp (Maeda et al., 2013) or whiteleg shrimp (Zokaeifar et al., 2014).

Penaeid shrimp are exposed to different salinities during their migration and osmoregulatory mechanisms allow them to tolerate environmental changes. Osmotic stress was used by Palacios and Racotta (2007) to assess the postlarvae quality and osmotic pressure variations can be a mean of estimating the physiological status of shrimp (Lignot et al., 2000). Moreover, others works have shown that lower cumulate mortality was observed in shrimps exposed to sudden salinity changes when probiotics were administrated (Franco et al., 2016; Liu et al., 2010). Therefore, probiotics can also enhance the animal ability to adapt to environmental variations.

Recently, the bacterial strain NC201 belonging to the *Pseudoalteromonas* genus was isolated from the environment of New Caledonia (Dufourcq et al., 2014). Previous work has demonstrated that NC201 had no pathogenic effect on *L. stylirostris* larvae and led, in larval rearing conditions, to survival rates equivalent to larvae treated with antibiotics (Pham et al., 2014). The isolated strain, identified as *Pseudoalteromonas* sp. NC201, was studied for its antibacterial potential and its whole genome has been sequenced (Sorieul et al., submitted).

The aim of the present study was to assess the probiotic effect of *Pseudoalteromonas sp.* NC201 in *L. stylirostris* juveniles and subadults when they were confronted to a pathogenic infection or a drastic salinity variation. The probiotic impact on the total heterotrophic flora and the host immune response were evaluated in non infected and infected conditions while the plasmatic osmotic pressure was measured during the salinity stress test. Experimental conditions triggering a beneficial effect due to the probiotic constitute a working frame allowing a deeper study of the physiological processes involved in shrimp health status.

Material and method

Animals

All the *L. stylirostris* shrimp used in the experiments were reared at the experimental station of Saint-Vincent (Boulouparis, New Caledonia). The breeders were stocked for 8 months in outdoor earthen ponds before transfer to the hatchery. Nauplii and postlarvae were obtained according to the pre-established protocol (Pham et al., 2012) and were stocked in $2m^3$ cylindroconical tanks filled with 5µm filtered seawater at a density of 180 larvae per liter the first day. Immediately after hatching the larvae production was split in two groups. One group was treated with probiotics NC201 (P) each other day all their life, at a final concentration of 10^5 $CFU.L^{-1}$, and the other one was reared in standard conditions (C) with erythromycin treatment (2.5 ppm) at days 3, 5, 7 and 9.

In hatchery, rearing water was thermoregulated at 29 °C and salinity was 35 ppt. Feeding started 24 h after stocking, microparticles and *Artemia salina* nauplii were added *ad libitum* all along the larval rearing period. The water was renewed at 50% at days 9 and 11, and every day from day 13. When they have reached postlarval stage 4 (day 19), animals were moved to 2 m^3 outdoor tanks at a density of $20L^{-1}$ for 15 days. To obtain juveniles (0.4 g) and subadults (15 g) of the C and P populations, postlarvae were kept in 2 m^3 tanks at a density of 2 L^{-1} for an additional month and 4 months, respectively. During rearing in $2m^3$ tanks, the water was 100% renewed over 18 h every other day before the probiotic administration. Animals were fed *ad libitum* with commercial pellets twice a day.

Probiotic production and pathogen culture

Pseudoalteromonas sp. NC201 (Pham et al., 2014) was used as the probiotic strain. *Vibrio nigripulchritudo,* pathogen of *L. stylirostris* (Goarant et al., 2006), was used for the bacterial challenge. All bacterial strains were grown in the same marine bacteria culture medium Zobell, in the same culture conditions: 0.5 L of broth medium in 1 L bottles, 16 h at 28 °C and shaken at 120 rpm.

Pathogen infection

Pathogen infection with *V. nigripulchritudo* was carried out on 128 subadult shrimps (15 g) of each C and P groups and split up into 200 L tanks at density of 32 animals per tank in quadruplicates. Four hours before infection, probiotic was administrated to P group. To carry out the experimental infection, the water volume was lowered to 100L and inoculated with the *V. nigripulchritudo* strain at a density of 10^5 $CFU.mL^{-1}$. Two hours post inoculation, tank water was renewed entirely. During the experimental infection, water was kept around 29 °C. Mortality was checked twice a day and the results were monitored as following: non infected control animals (NIC), non infected probiotic animals (NIP), infected control animals (IC) and infected probiotic animals (IP). Animal sampling occurred before probiotic administration at T0, 10 animals were drawn from C and P populations. Sampling involved puncture of animals with 23-gauge 1 mL sterile syringes and withdrawal of approximatively 250 µL of hemolymph. A volume of 20 µL of hemolymph was destined to bacterial count. Similar samplings were performed on 10 animals from NIC, NIP, IC and IP animals 4, 10 and 24 h post infection (T4, T10 and T24). At T24, 150 µL of hemolymph were used for RNA extraction.

Resistance to salinity stress

Two in vivo experiments were carried out comparing control group (C) and probiotic group (P). Different salinity media (3 ppt, 5 ppt and 55 ppt) were prepared from 5µm-sterilized seawater by adding either freshwater or marine salt (Reef Crystals, Aquarium Systems). Media

were prepared 2 days before the challenge to allow evaporation of any potential chlorine residue from tap water. Water temperature at shrimp transfer was 21.7 °C. In the first trial, early juveniles (0.4 g mean weight) were transferred directly from seawater at 34.3 ppt to 3 ppt (C3 and P3 treatments) or 55 ppt (C55 and P55 treatments) for 72 hours. Each treatment was tested in triplicates with 12 animals per 20 L aquaria. In a second experiment conducted on subadults (15g), only hyposaline condition (5.0 ppt ± 0.0) was compared with control condition (32.7 ppt ± 0.1) in 30 L aquaria. Forty animals of each group (C and P) were distributed in 5 aquaria, at a density of 8 animals per aquarium, from seawater to seawater (C33 and P33 treatments) or to desalted water (C5 and P5 treatments). Shrimp survival was monitored over 48 h twice a day and water temperature maintained at 25.1 °C. All aquaria were constantly aerated and no feed was provided during the stress test. Water salinity was checked with an osmometer (WESCOR Vapro 5600, USA) and osmolality was expressed in $mOsm.kg^{-1}$. On the subadults, the hemolymph osmolality was measured on 10 µL sampled on 10 animals from each treatment.

Bacterial count and identification

The total heterotrophic flora (THF) in the shrimp hemolymph was determined on juvenile animals (8 g) after 75 days of impregnation and after an infection challenge *via* a plate count method. A hemolymph volume of 20 µL from 10 shrimp was plated in duplicate on glycerol containing Zobell-agar. The THF was expressed in $CFU.mL^{-1}$. NC201 was counted based on morphological identification (round, shiny, bright egg-yolk like orange-yellow) and *V. nigripulchritudo* was identified through color (colonies appear dark-grey/black when glycerol is present in the medium). Randomly selected colonies showing a similar morphology to NC201 were isolated and stored for MALDI-TOF identification.

Using a MALDI-TOF Microflex coupled to the Biotyper 3.0 software (Brüker Daltonik), a standard protein profile of NC201 was established after reading 8 spots of NC201 in triplicates. Profiles of *Pseudoalteromonas flavipulchra* (DSM 14401), *P. peptidolytica* (DSM 14001) and *P. piscicida* (DSM 6809) were also established in same conditions and added to the reference bank used for further analysis. The range of masses observed was set between 2 and 20 kDa. An α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix was used on samples directly spotted on the reflective plate without any further extraction step. A total of 8 strains (6 and 2 from P shrimp and C shrimp groups, respectively) presenting the NC201 morphotype were analyzed. The profiles of these randomly isolated colonies were compared to the database for identification. The Biotyper 3.0 software was used to establish distances scores between the measured specters.

Relative gene expression of antimicrobial peptide genes

Hemolymph in subadults (15 g) was collected 24 h post infection. Ten non infected and ten infected animals from each group (C and P) were sampled, 150 µl of hemolymph were preserved in an equal volume of sodium citrate prior to hemocyte pelleting through centrifugation. The extracted total RNA (200 ng) was linearized through incubation at 70 °C for 5 min then reverse transcripted.

Expression level of the genes *Litsty pen3* and *lys* (GenBank accession numbers AY351655 and CV699332), respectively coding the antimicrobial peptides (AMPs) penaeidin 3 and lysozyme were measured by quantitative real time RT-PCR (qPCR). This analysis was performed on an ABI7300 (Applied Biosystems). Amplification efficiencies of all qPCR primers were determined using previously described method (Pfaffl, 2001). Melting curves were used to verify the

specificity of the amplification. The results were normalized with the elongation factor EF1-α (accession no. AY117542.1), a housekeeping gene already used as a reference standard in *L. stylirostris* (Pham, 2011). Real-time PCR primer sequences of antimicrobial peptides were previously published (de Lorgeril et al., 2008). Each run included the cDNA control, negative controls (total RNA treated with DNase I), and blank controls (water). The relative expression of *Litsty pen3* and *lys* to EF1-α at each condition were calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis

Cumulated mortality data were normalized through an arcsine square root transformation before analysis through a two way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test.
The data obtained from the RT-PCR analysis were subjected to two way analysis of variance (ANOVA) using Excel Stat; the ANOVA was followed by Tukey's test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Effect of NC201 administration on THF evolution in the hemolymph

The bacterial flora in the shrimp hemolymph in C (control) and P (probiotic) groups was assessed. The average count of total heterotrophic flora (THF) was between 2 and 3 log $CFU.mL^{-1}$ (Figure 1A). No significant difference of THF between C and P groups was noted over the time course, but a slight increase of THF was observed 6 h post administration in the probiotic group. The percentage of NC201 in the THF (orange-yellow colonies) among cultivable flora in the hemolymph was evaluated on morphological characteristics (Figure 1B). Before administration of NC201 in the P group, no orange colony was observed in both groups. In the C group, a few proportion of orange-yellow colonies, below 5% of the THF, was detected in the first 12 hours while in the P animals, the percentage of orange-yellow colonies reached 47% two hours after administration and slowly decreased over 24 h to 22%.

NC201 identification via MALDI-TOF-MS

The strain NC201 was analyzed by MALDI-TOF-MS (Figure 2). NC201 displayed a profile composed of 11 major peaks at *m/z* 4237, 4491, 4738, 5140, 6119, 7208, 7529, 9477, 9947 and 11337. After comparison with the database and the others *Pseudoalteromonas* analyzed, an additional 10 distinguishable peaks were observed. These peaks were used as a reference for comparison with the spectrum of the closely related *P. flavipulchra* and *P. piscicida*. The comparison with *P. piscicida* DSM6609 (Figure 2) revealed 10 peaks in common, within the *m/z* ± 2, distributed along the mass panel: 4237, 4739, 5669, 6120, 6430, 7530, 8449, 9477, 9947, 11337. NC201 was also compared to *P. flavipulchra* NCIMB2033 (data not shown). This strain showed 7 shared peaks: 4739, 6120, 6430, 7208, 7530, 8449, and 9477, within *m/z* ± 2. Only the peak at 7208 is specific to NC201 and *P. flavipulchra* NCIMB 2033, the 6 others are common to the three strains.
The 10 colonies, with the same morphotype (orange-yellow) as NC201, randomly picked from the P animals showed a proteic specter identical to NC201 (Table 1). The two colonies isolated in C animals with a morphotype similar to NC201 showed specter that did not match with NC201 (data not shown).

Survival to infectious stress

A pathogenic challenge with *Vibrio nigripulchritudo* was used to determine the sensitivity to pathogens of animals treated with NC201 (P) compared to non treated ones (C). Both non infected control (NIC) and probiotic treated animals (NIP) do not display any significant mortality over the course of this experiment (Figure 3). In IC animals, mortality started 24 h post challenge. At 48 h post infection, infected control (IC) animals showed a mortality of 17% whereas infected probiotic (IP) animals did not yet display any mortality. At 68 h post infection, IC animals showed an increased mortality at 28% and the IP a significantly lower one at 7%. From there, the mortality increased gradually in IC animals to 48%, 144 h post infection. Mortality also increased gradually in IP animals to reach 24% at 144 h post infection. The cumulated mortality of IC animals was significantly higher than mortality of IP animals from the onset of observed mortality in IC animals at 24 h post infection all the way though the observed time course (144 h).

Bacterial count in hemolymph during the infectious challenge

The total heterotrophic flora (THF) present in the hemolymph was numbered over the course of the experiment (Table 2). Initial populations in NIC and NIP animals were of 3.12 log (± 0.59) and 3.21 log (± 0.44) CFU. mL^{-1}, respectively. At 24 h post infection, the THF in NIC, NIP, IC and IP animals amounted to 3.75 log (± 0.92), 3.97 log (± 0.92), 3.87 log (±0.44) and 3.97 log (± 0.44) CFU.mL^{-1}, respectively. THF of all treatments seem to increase over time though not significantly. No significant difference in THF amount could be observed between treatments. The presence of the probiotic and the pathogen bacteria *V. nigripulchritudo* was monitored during infectious challenge (Figure 4). Before infection, 15% of the THF was represented by NC201 (Figure 4A). The NC201 rate in NIP group decreased slowly to reach 12%, 9% and 3% at 4 h, 10 h and 24 h post infection, respectively. In the IP group, the NC201 percentage in the hemolymph was 2% only 4 h post infection, and continued to decrease to reach 0.5% at 24 h. No *V. nigripulchritudo* was detected in animals before infection challenge in both control and probiotic groups (Figure 4B). At 4 h post infection, proportion of the pathogen in the IC group was 33% (110 CFU.mL^{-1}), decreased to 17% (460 CFU. mL^{-1}) at 10 h and 22% (1614 CFU.mL^{-1}) at 24 h. However, from 4 to 24 h, no significant difference was noted in the IC group. In the IP group, *V. nigripulchritudo* represented 3 and 2% (88 and 16 CFU.mL^{-1}) of the THF at 4 and 10 h, respectively, and reached 13% (1218 CFU.mL^{-1}) at 24 h. This represents a significant increase at 24 h for the IP group. At 4 and 10 h, the proportion of *V. nigripulchritudo* found in the THF was significantly lower in IP compared to IC animals, whereas the difference observed at 24 h was not significant.

Expression level of lysozyme and penaeidin 3

The expression levels of two genes linked to the immune response, lysozyme (*lys*) and penaeidin 3 (*pen3*) were measured 24 h after exposure to the pathogenic *Vibrio*. The expression level of *lys* in unchallenged animals was significantly lower in NIP compared to NIC animals (Figure 5). The challenged animals show a lower expression than unchallenged ones, but this diminution was not significant for either population. Comparing challenged animals, *lys* relative expression was also lower in IP group compared to IC group. The number of *pen3* transcripts in unchallenged conditions was lower for control compared to probiotic animals, though the difference was not significant (Figure 5). At 24 h after infection, a non significant increase of *pen3* expression in IC animals compared to NIC was observed, while a significant decrease in IP animals compared to NIP was measured. With a number of transcripts higher

for the IC group than the IP group, the difference between infected populations was significant.

Survival to salinity stress

The first osmotic stress was conducted on juvenile stages (0.4 g) in hypersaline (55 ppt) and hyposaline (3 ppt) conditions (Figure 6). Three hours after transferring animals at 55 ppt, mortalities of 5% and 3% were observed in the control (C55) and probiotic (P55) groups, respectively. The mortality increased in C55 group to reach 16% at the end of the trial while the loss in the P55 group was only 6%. In the 3ppt condition, 10% and 9% of the control population (C3) and the probiotic ones (P3) were dead after 12 h, respectively. At 24 h, mortalities reached 23% in the C3 group while no additional dead animals were noticed in the P3 group. Cumulative mortalities were significantly different at the end of the experiment between C55 (16%) and P55 (6%) on the one hand, and between C3 (23%) and P3 (14%) on the other hand. In both cases, the final survival rate was significantly improved by the addition of NC201. The non-stressful control condition showed a 100% survival rate over the 72 h of the experiment for both treated and non-treated populations (data not shown).

As shrimps were more sensitive to hyposaline conditions, the experiment focusing on subadults (15 g) was performed at 5 ppt only (Figure 7). The transfer in isosaline conditions (32.7 ppt) induced a mortality after 10 h and at the end of experiment, 7.5 and 10% were lost in the control and probiotic treated animals, respectively. In hyposaline conditions, mortality started after 6 h of exposure with 8% for control and 3% for probiotic animals. In the first 24 h of exposure, a regular increase of mortality was observed in both C and P populations that reached 43 and 35%, respectively but the difference was not significant. Twenty six hours post stress, significant difference in mortality has been observed between the two groups with 50% and 35% for C3 and P3 populations, respectively. Final cumulated mortality at 48 h was not significant, 57% and 40% for the control and the treated groups, respectively.

Plasmatic osmotic pressure

The use of shrimp subadults (15 g) allowed us to measure variations of hemolymph osmolality versus external osmolality illustrated in figure 8. Average salinity in the tanks in isosaline transfer was 32.7 ppt (962 $mOsm.kg^{-1}$). A slight decrease of the osmolality in both control (C33) and probiotic (P33) populations in the first 8 hours was observed, from 780 $mOsm.kg^{-1}$ to 740 $mOsm.kg^{-1}$, followed by an increase back to initial value at 24 hours. The transfer in hyposaline conditions at 5 ppt (147 $mOsm.kg^{-1}$) induced a strong osmolality drop in the control group (620 $mOsm.kg^{-1}$ at 4 hours, 520 $mOsm.kg^{-1}$ at 8 hours) as well as in the probiotic group (595 $mOsm.kg^{-1}$ at 4 hours, 540 $mOsm.kg^{-1}$ at 8 hours) with no significant difference. Twenty four hours post challenge, the osmolality in these animals increased significantly ($p < 0.05$) to 590 $mOsm.kg^{-1}$ and 640 $mOsm.kg^{-1}$ for the C5 and P5, respectively. .

Discussion

In *Litopenaeus vannamei,* shrimp microbiota depends on larval developmental stages (Nimrat et al., 2012; Zheng et al., 2016), overall health status (Zheng and Wang, 2016), diet (Zhang et al., 2013) or probiotic administration (Sha et al., 2016). In our study, the total heterotrophic flora (THF) in the subadult *L. stylirostris* hemolymph showed no quantitative difference in noninfectious conditions. However, animals receiving probiotic showed a peak proportion of NC201 in the first hours of administration representing up to 40% of the THF. In *L. vannamei*, Nimrat et al. (2012) have shown that the quantity of THF found in the whole postlarvae was

not impacted by the use of *Bacillus spp*. as probiotics through feed administration, but the *Bacillus* proportion in the THF increased from PL1 to PL22 to reach 10 fold higher in treated animals than control ones. The authors suggested that these results might be due to a progressive substitution of a part of the gut microflora by the administered probiotic. Similar results were reported in *Fenneropenaeus indicus* postlarvae by Ziaei-Nejad et al. (2006) where a commercial *Bacillus spp*. probiotic mixture could represent 88% of the total bacteria while THF quantity was similar in control and treated groups. These results concur with the ones obtained with *Pseudoalteromonas* NC201 and support the hypothesis that the hemolymph microflora is tightly regulated (Wang and Wang, 2015).

Strain orange-yellow pigmentation was used as a primary tool to distinguish and quantify NC201 in the THF. This quick identification method was confirmed by the analysis of its proteic specter, NC201 displaying a unique pattern of peaks through MALDI-TOF analysis. Observation of morphology had to be confirmed to ensure reliable identification since less than 5% of the colonies observed in the THF of control animals showed a morphotype similar to NC201. These colonies were later identified as different from NC201. In addition, the profile of NC201 represents another profile of *Pseudoalteromonas* to add to a MALDI-TOF biotyper profile database established by Emami et al. (2016). NC201 displayed one of the two peaks common to all *Pseudoalteromonas* at *m/z* 4236, the other peak at *m/z* 5095 could not be distinguished (Dieckmann et al., 2005; Emami et al., 2016). It is possible that the peak at *m/z* 5095 is present but not distinguishable due to the intensity of the *m/z* 5140 peak. Comparison of the NC201 mass specter to those other published *Pseudoalteromonas* (Emami et al., 2016), revealed numerous shared peaks with other species. The NC201 strain showed 3 peaks similar to the ones found in *P. ulvae* and *P. aurantia* and 4 peaks similar with *P. citrea*. The profile of NC201 was established without any extraction step prior to MALDI-TOF analysis. This process could help refine the profile of the probiotic strain and allow a finer comparison to the spectra of other *Pseudoalteromonas* obtained after an extraction step (Dieckmann et al., 2005; Emami et al., 2016). The *Pseudoalteromonas flavipulchra* NCIMB2033 and *P. piscicida* DSM14401 profiles have shown that the biotyping method could be reliably used for the *Pseudoalteromonas* genus; closely related species show profiles similar enough to be classified as belonging to the same genus but with enough distinctive peaks to take both species apart and avoid misidentification. As 16S ribosomal RNA sequences proved insufficient for species identification of *Pseudoalteromonas* (Sorieul et al., submitted), the MALDI-TOF identification method provides a reliable alternative (Carbonnelle et al., 2012). Moreover, the comparison of the NC201 specter to the closely related *P. flavipulchra* and *P. piscicida* confirmed the greater distance between *P. flavipulchra* NCIMB 2033 and NC201 than between *P. piscicida* and NC201. This method could help to determine if *P. flavipulchra* JG1 is as close to NC201 and *P. piscicida* as its genome sequence suggests (Sorieul et al., submitted). Unfortunately, *P. flavipulchra* JG1 is not a reference strain and not available until now in database. A dedicated marine bacteria bank would be useful to identify other bacteria isolated from the microflora of the shrimp. Attempts to use this tool for marine bacteria identification have already been tried on the flora present in ballast waters (Emami et al., 2012) and for marine pathogens (Kim et al., 2017). Future work will be focused on the hemolymph microflora and the measure of its diversity by the addition of marine bacteria to the original database. The profiles of reference marine bacteria should fill the gaps of the manufacturer database and allow an identification of almost all isolated strains at the genus level.

An early invasion of the hemolymph by NC201 as well as an overall tendency to higher bacterial presence (up to 0.9 log in the hemolymph of *L. stylirostris* have been observed in our

study as reported in *L. vannamei* juveniles (Gomez-Gil et al., 1998) and over 1 log higher than the bacteria found in healthy *M. japonicus* (Fagutao et al., 2009; Wang et al., 2014). This colonization of the shrimp hemolymph was transient since it disappeared completely between 24 h and 48 h, even if 2 h post administration, NC201 represented half the bacteria present in the hemolymph. This phenomena raises question regarding the cause of this disappearance: was NC201 targeted by the immune system, did it migrate to other tissues or did the bacteria simply die out because not adapted for prolonged life in the hemolymph. Another explanation for the disappearance of NC201 in the hemolymph could be the autolytic activity observed in some *Pseudoalteromonas* strains (Holmström and Kjelleberg, 1999).

NC201 belongs to the *Pseudoalteromonas* genus and was selected for its antibacterial potential towards pathogenic *Vibrio* (Pham et al., 2014). Studies showed the interest for strains of this genus for use in aquaculture, such as two *Pseudoalteromonas sp.* (Goulden et al., 2012; Leyton et al., 2017) and *P. undina* (Banerjee and Ray, 2017). Due to the synthesis of antibacterial compounds, these marine bacteria can have a beneficial (Kesarcodi-Watson et al., 2012) or detrimental (Neu et al., 2014) effect on marine organisms and are therefore a source of potential probiotics. MALDI-TOF results showed NC201 to be related to *P. piscicida* and *P. flavipulchra*, two species belonging to the pigmented clade with high antibacterial potential (Offret et al., 2016). These results confirm previous genome comparisons that showed a high level of similarity between *P. piscicida* and NC201. The genome comparison revealed that NC201 was even more closely related to *P. flavipulchra* JG1 (Sorieul et al., submitted). The *P*. *flavipulchra* JG1 is capable of synthesizing multiple antibacterial compounds and is therefore considered for probiotic use (Yu et al., 2012). A pathogenic challenge was therefore particularly adapted for the evaluation of the probiotic effect of NC201.

Probiotics are known to improve resistance toward infectious stresses caused either by viral (Leyva-Madrigal et al., 2011) or bacterial agents (Balcázar et al., 2007b; Vaseeharan and Ramasamy, 2003; Zokaeifar et al., 2012). In our study, it appears that NC201 has a protective effect on *L. stylirostris* against a *V. nigripulchritudo* challenge as survival rates were significantly improved by the probiotic treatment in subadults confronted with infectious stress. Animals treated with probiotics and then infected with *V. nigripulchritudo* have shown a mortality onset delayed by 24 h in comparison to infected controls. Better survival rates due to probiotics have been reported in *L. vannamei* infected with *V. parhaemolyticus* (Kongnum and Hongpattarakere, 2012) or *V. harveyi* (Vieira et al., 2007). The delay in mortality appearance in probiotic group in our experiment could be explained either by a direct antibacterial action of NC201 against *V. nigripulchritudo*, as shown by studies of NC201 inhibitory potential (Sorieul et al., submitted) or by an indirect effect such as an improvement of the shrimp overall health or the stimulation of its immune system. The pathogen prevalence in our study was much higher in animals with no probiotic administration, four hours after infection. The observed presence of NC201 in the hemolymph and its previously described antibacterial effect against *V. harveyi, V. nigripulchritudo* and *V. penaeicida* (Pham et al. 2014, Sorieul et al., submitted) could explain this delayed presence of the pathogen. Similar results were observed by different authors who have demonstrated that probiotics could lower the prevalence of pathogens such as bacteria (Vieira et al., 2007) or viruses (Leyva-Madrigal et al., 2011) in *L. vannamei*.

The experimental infection was performed four hours after probiotic administration, at the time corresponding to the peak presence of NC201 in the hemolymph, a direct antibacterial effect is then possible, similar to the way the hemolymph of *Marsupenaeus japonicus*

maintains a low bacterial presence (Wang et al., 2014). The presence of probiotic in shrimp could also have a stimulating effect on the immune response (Rodríguez et al., 2007; Zokaeifar et al., 2014). As seen previously, the microflora of the hemolymph is highly controlled, mainly through antimicrobial peptides (AMP) synthesized by the hemocytes (Wang et al., 2014).
Two AMP markers, the lysozyme (*lys*) and the penaeidin 3 (*pen3*) were used for their involvement in immune response (Fall et al., 2010; Muñoz et al., 2002). In our study, 24 h after challenge with *V. nigripulchritudo* the expression levels of *lys* were not affected by the infection but the expression levels were significantly lower in shrimp treated with NC201. The lysozyme is classified as an antimicrobial peptide with lytic activity against both Gram positive and Gram negative bacteria (Tassanakajon et al., 2013) and against WSSV in *L. stylirostris* (Mai and Wang, 2010) whereas penaeidins are usually known to inhibit fungi and Gram positive bacteria (Tassanakajon et al., 2013). In *L. stylirostris* adults infected with *V. penaeicida* (de Lorgeril et al., 2005, 2008), surviving shrimps showed an increased expression of *lys* whereas non surviving shrimps showed a decrease in *lys* transcript numbers. In our study, the control animals were more affected by infectious stresses than the probiotic animals despite a higher expression level of *lys.* However, the transcript abundance could be due to the period of sampling. As demonstrated by Burge et al. (2007), a 48 h time course of the expression level of *lys* in *L. vannamei* exposed to *V. campbellii* showed that expression levels depended on the sampling time in hemocytes. The expression level is also dependent of the observed tissue with dynamics that can be very different (Burge et al., 2007). However, comparisons between studies have to be carefully considered as infection trials conducted by bathing and injection yield different results regarding immune genes expression levels. A time course of the *lys* expression level showed a 3 fold increase at 48 h post infection whereas expression levels seemed diminished at 12 and 24 h. The lowered expression of *lys* in shrimp treated with NC201 could be related to the lower exposure to *V. nigripulchritudo*. It also appears that animals treated with NC201 have a lower base expression level than control animals which could be a sign of NC201 effect on the expression of *lys*.
In our study, *pen3* expression levels of non infected animals seemed not to be significantly modified by the addition of NC201 which is consistent with previous results in whole larvae (Pham et al., 2014). However, infected animals showed an expression level lowered by the presence of probiotics. Infected treated animals also showed to be significantly lower than infected control shrimp, which suggests an effect of the combination of infection and probiotic. As observed for *lys* expression, *pen3* levels are lower in animals treated with probiotics after pathogenic challenges. Lower expression levels can be linked with immune failure and imminent death, as observed during *V. penaeicida* challenges in *L. stylirostris* (de Lorgeril et al., 2008). These authors showed that animals with decrease *pen3* expression did not survive whereas surviving animals maintained the initial *pen3* level. It is worthy to note that *pen3* is mainly expressed in hemocytes (Bachère et al., 2000; Destoumieux et al., 2000) and therefore the lower expression level in the sampled tissue reflects overall expression. In the hemocytes of *L. vannamei*, overexpression of *pen3* has been reported following injection of a mix of pathogens, including *V. alginolyticus* (Destoumieux et al., 2000). As the mortality onset between control and IP was delayed by 24 h, it would have been interesting to include further time points.
A direct antibacterial action of NC201 on *Vibrio* could also explain the lower expression levels of the two AMP. The probiotic might inhibit pathogenic *Vibrio* to such extend that the immune system of the shrimp did not register any threat markers and lowered the expression levels of its effectors. This effect could be compared with the usual consequences of antibiotic

treatment on the shrimp immune status, lowering expression levels of key immune genes (Fagutao et al., 2009).

Hemolymph osmolality is a direct marker of the impact of a salinity change on the physiology of the animal (Lignot et al., 2000; Péqueux, 1995). The impact of different factors on this physiological parameter has already been studied in *L. stylirostris* (Mugnier and Soyez, 2005; Wabete et al., 2006). In both hyper and hyposaline challenges, early juveniles treated with probiotics showed an improved survival rate when compared to controls. We noted that hyposaline stress had a stronger impact on survival rate than the hypersaline stress, as already reported in *L. vannamei* postlarvae (Liu et al., 2010). The faster effect of a hyposaline stress was therefore chosen for experiments on subadult stages. Survival rates were also improved by the probiotic treatment in shrimp submitted to hyposaline stress. NC201 showed again a protective effect against salinity changes probably due to a general improvement of the shrimp's health status (Lignot et al., 2000). To confirm this hypothesis, plasmatic osmotic pressure was measured in probiotic and control populations. A slight variation in osmotic pressure was observed in the isosaline transfer and could be rely on transfer stress (Wabete et al., 2008). In our studies, the strong disturbance observed at low salinity is not significantly different in both populations until 8 h post challenge, but probiotic animals recover faster than the control population at 24 h post challenge. Stressors could induce alterations of transporting epithelia osmoregulatory tissues (Lignot et al., 2000) with higher cells damage in control animals. However, monitoring over a longer period would have shown if treated animals were able to make a full recovery in a shorter time than control ones.

Global betterment of the shrimp's health is suggested by the increased survival rate during abiotic challenges and confirms the effect of NC201 as a probiotic. But this beneficial effect has yet to be explained, this is why the observation of the expression levels of other immune parameter and their evolution over a time course is going to be the focus of our next study.

This study confirms the safety of an administration of NC201 towards subadult shrimps and highlights the protective effect of this bacteria against both biotic and abiotic stresses. They might be used to measure expression level of other genes involved in the response to stresses like immune response, but also homeostasis and osmotic balance.

Acknowledgments

This work was partly supported by the Provincial Institutions (Province Sud, Province Nord et Province des Iles Loyauté) and the Government of New Caledonia. Thanks are due to the zootechnical staff of SASV in supplying animals. The authors also thank the Institut Pasteur of New Caledonia (IPNC) and the "Plateforme de Recherche pour les Sciences du Vivant de Nouvelle-Calédonie" (PFV-NC) for allowing access to the MALDI-TOF platform and the qPCR facility. Any opinions, findings, and conclusions or recommendations expressed in this material are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the supporting bodies mentioned herein.

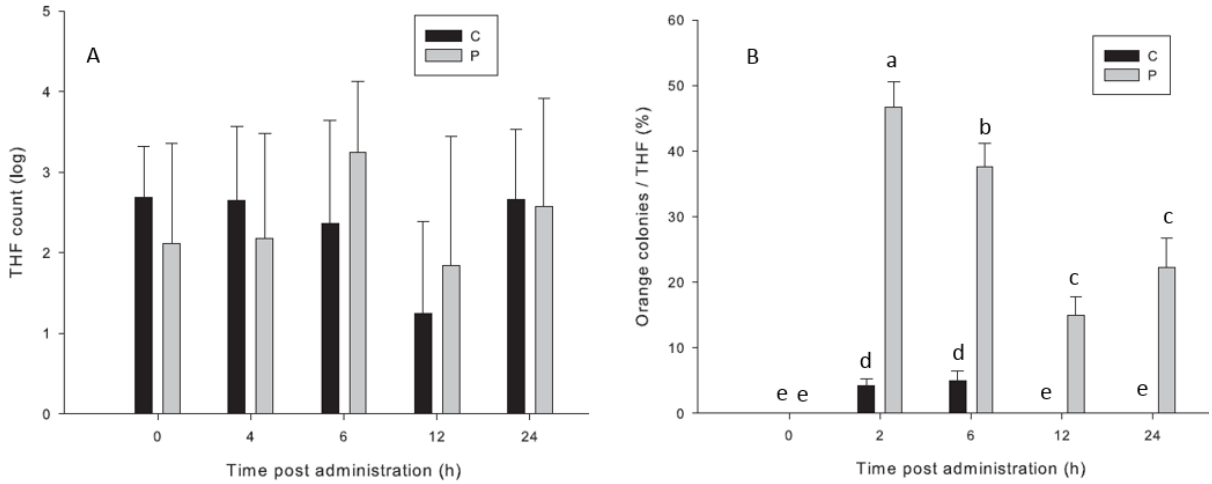


Figure 1: Evolution of the total heterotrophic flora (geometric mean in Log CFU.mL^{-1}) in the *L. stylirostris* hemolymph (A); orange-yellow colonies percentage in the total heterotrophic flora (THF) of *L. stylirostris* hemolymph (B). Control treatment (C), animals treated with NC201 (P). Bars sharing different letters are significantly different ($P < 0.05$)

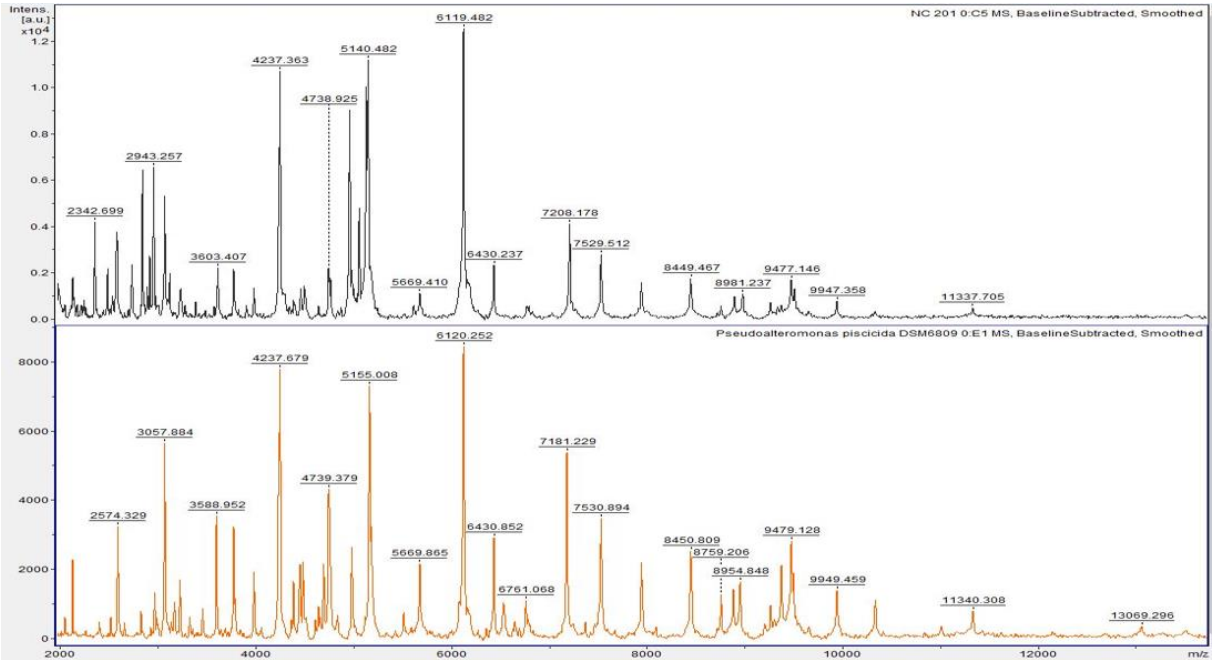


Figure 2: Protein profile, by MALDI-TOF-MS, of *Pseudoalteromonas*, NC201 (top) and *P. piscicida* DSM 6609 (bottom).

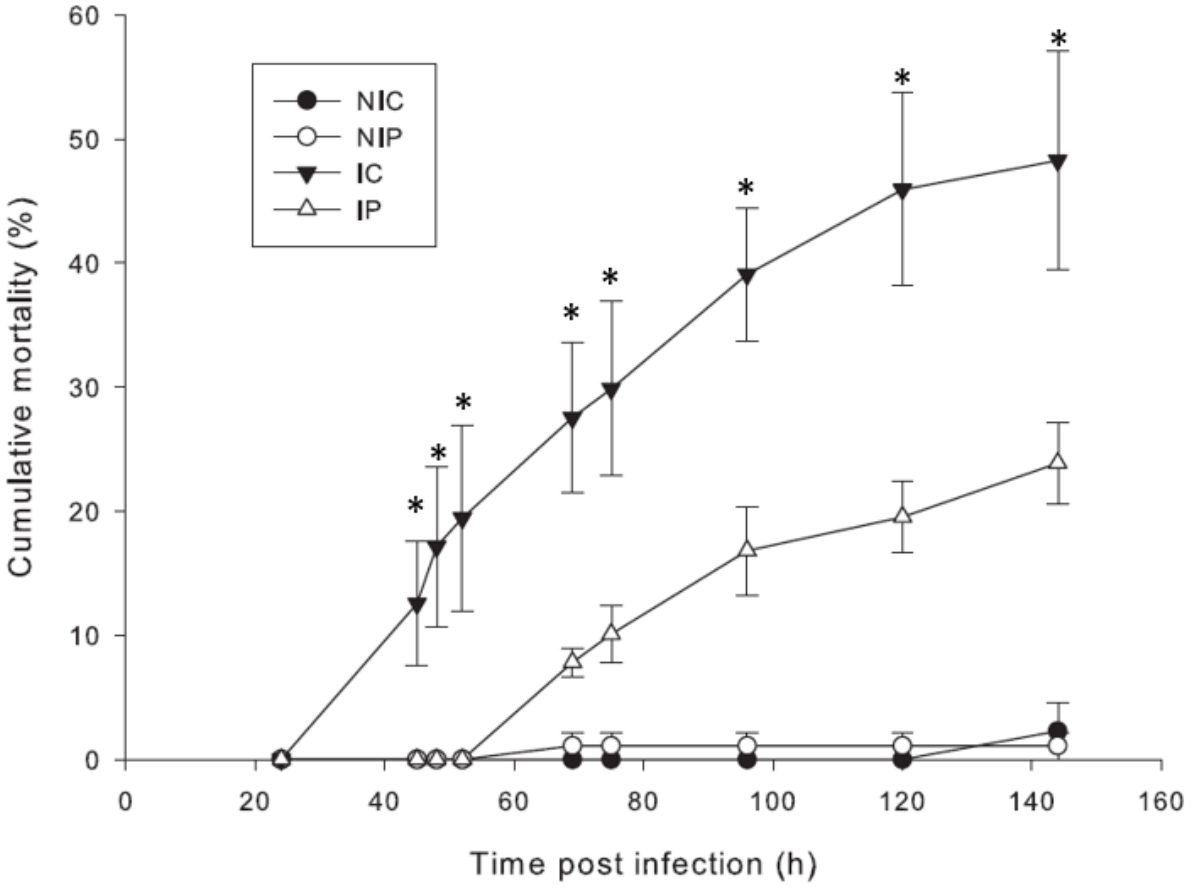


Figure 3: Cumulative mortality in subadult shrimp (15 g) challenged by *V*. *nigripulchritudo*. Non infected control shrimp (NIC), non infected shrimp treated with probiotic (NIP), infected control shrimp (IC) and infected shrimp treated with probiotic (IP). Statistical difference due to absence of probiotic ($P < 0.05$) are marked with an asterisk (*).

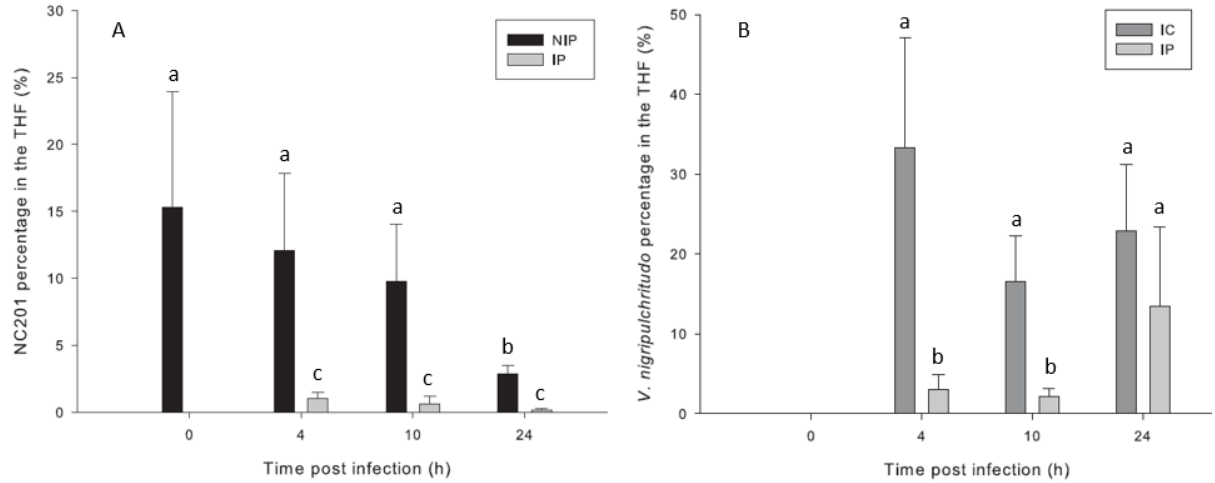


Figure 4: Proportion of *Pseudoalteromonas*, NC201 (A) and *V*. *nigripulchritudo* (B) in the total heterophic flora (THF) of subadult shrimps (15 g) challenged by *V*. *nigripulchritudo*. Non infected shrimp treated with probiotic (NIP), infected control shrimp (IC) and infected shrimp treated with probiotic (IP). Bars sharing different letters are significantly different (P < 0.05).

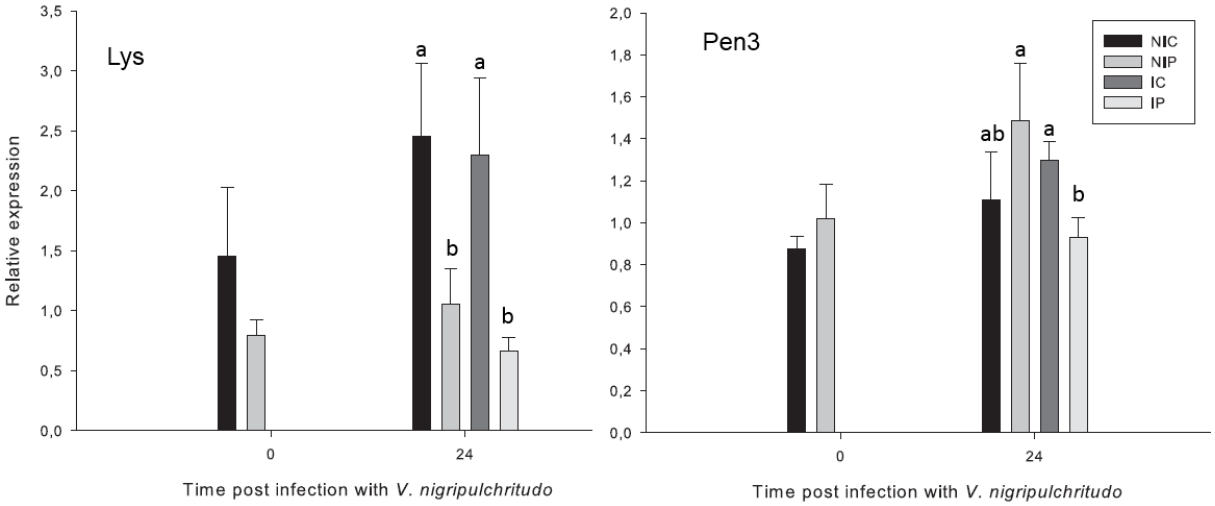


Figure 5: Relative expression of lysozyme and penaeidin 3 in hemocytes of subadult shrimps (15 g), at 0 and 24 hours after challenge with *V*. *nigripulchritudo*. Non infected control shrimp (NIC), non infected shrimp treated with probiotic (NIP), infected control shrimp (IC) and infected shrimp treated with probiotic (IP). Bars sharing different letters are significantly different (P < 0.05).

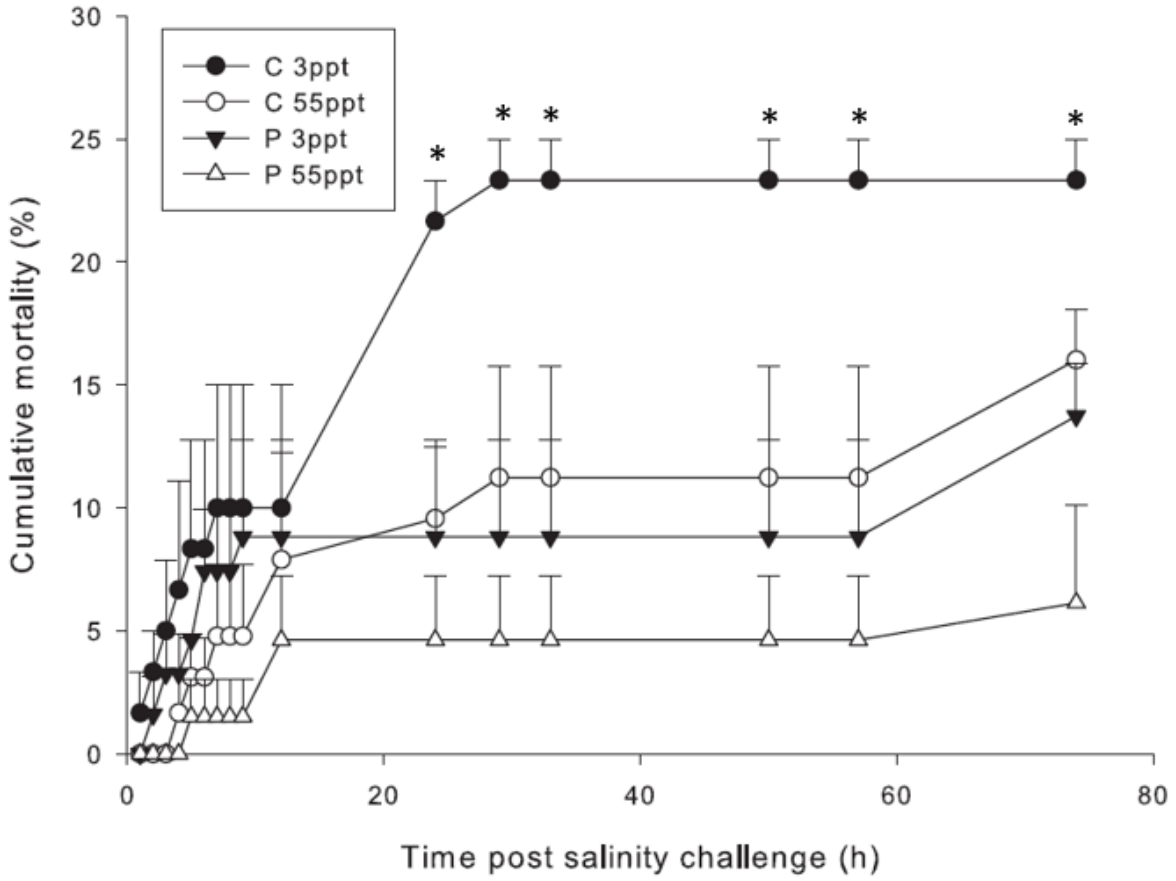


Figure 6: Cumulative mortality in juvenile shrimps (0,5 g) challenged by salinity stress. Control shrimp in hyposaline conditions (C 3ppt), shrimp treated with NC201 in hyposaline conditions (P 3ppt). Control shrimp in hypersaline conditions (C 55ppt), shrimp treated with NC201 in hypersaline conditions (P 55ppt). Statistical difference due to absence of probiotic ($P < 0.05$) are marked with an asterisk (*).

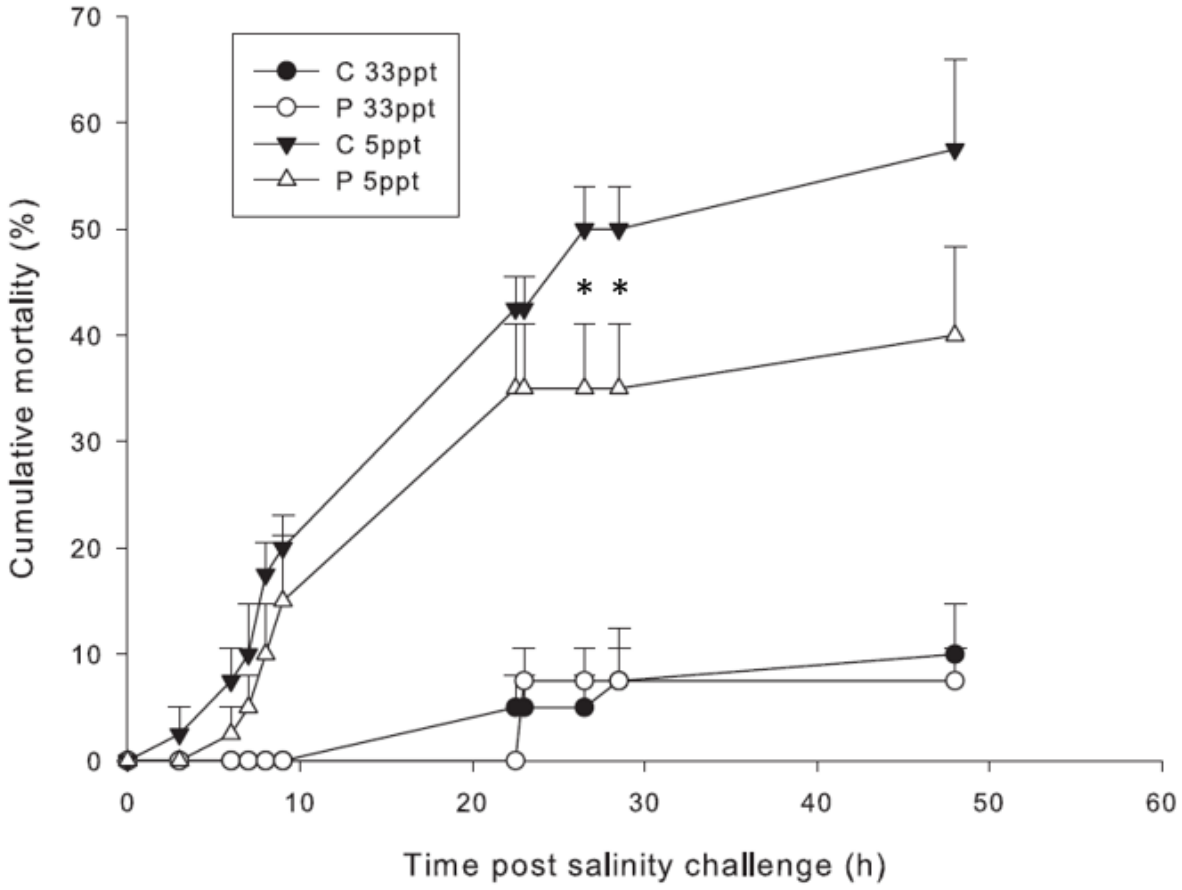


Figure 7: Cumulative mortality in subadult shrimps (15 g) challenged by a hyposaline stress. Control shrimp in isosaline conditions (C 33ppt), shrimp treated with NC201 in isosaline conditions (P 33ppt), shrimp in hyposaline conditions (C 5ppt) and shrimp treated with NC201 in hyposaline conditions (P 5ppt). Statistical difference due to presence of probiotic ($P < 0.05$) are marked with an asterisk (*).

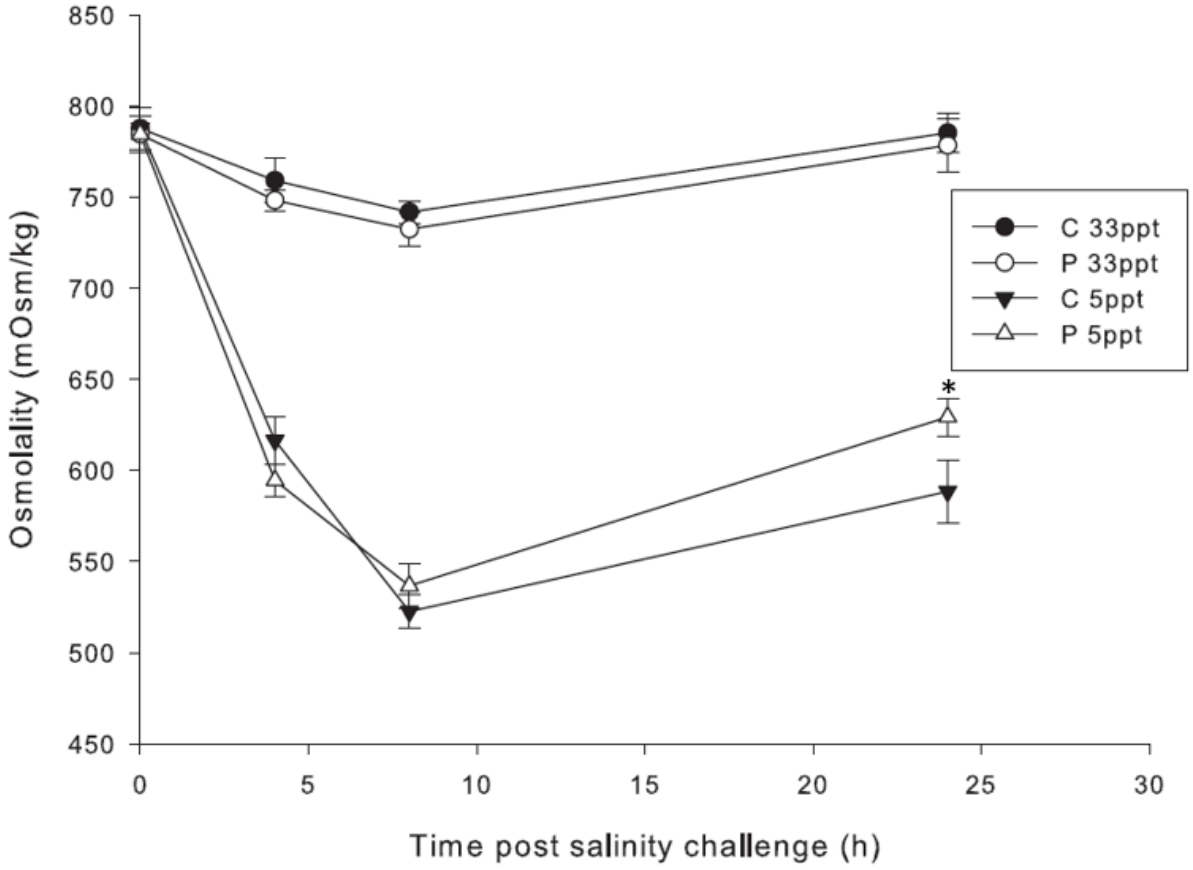


Figure 8: Hemolymph osmolality of the in subadult shrimps following isosaline (33ppt) and hyposaline (5ppt). Control shrimp in isosaline conditions (C 33ppt), shrimp treated with NC201 in isosaline conditions (P 33ppt), control shrimp in hyposaline conditions (C 5ppt) and shrimp treated with NC201 in hyposaline conditions (P 5ppt). Statistical difference due to presence of probiotic ($P < 0.05$) are marked with an asterisk (*).

Table 1: Identification, using MALDI-TOF-MS, of bacterial colonies (orange-yellow), isolated from hemolymph and digestive tract in *L. stylirostris* following the probiotic NC201 treatment.

Time post probiotic administration (h)	Tissue	Identification	Score
2	Hemolymph	NC201	2,513
2	Hemolymph	NC201	2,582
2	Hemolymph	NC201	2,59
6	Hemolymph	NC201	2,55
6	Hemolymph	NC201	2,598
12	Hemolymph	NC201	2,27

Table 2: Evolution of the total heterotrophic flora (geometric mean in Log CFU.mL^{-1}) in the *L. stylirostris* hemolymph during *V. nigripulchritudo* infection, of non infected control animals (NIC), non infected animals treated with NC201 (NIP), infected control animals (IC) and infected animals treated with NC201 (IP).

Time post infection, h	0	4	10	24
NIC	3.12 ± 0.59	2.95 ± 1.25	3.17 ± 0.88	3.75 ± 0.92
NIP	3.21 ± 0.44	2.98 ± 0.90	2.82 ± 1.35	3.97 ± 0.92
IC	3.12 ± 0.59	2.54 ± 0.43	3.43 ± 0.65	3.87 ± 0.66
IP	3.21 ± 0.44	2.47 ± 1.13	2.90 ± 0.82	3.97 ± 0.81

References

Aguirre-Guzmán, G., 2012. The use of probiotics in aquatic organisms: A review. African J. Microbiol. Res. 6, 4845–4857. doi:10.5897/AJMR11.1038

Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M., Mohsin, M., 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. Fish Shellfish Immunol. 45, 733–741. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.038

Antony, S.P., Singh, I.S.B., Jose, R.M., Kumar, P.R.A., Philip, R., 2011. Antimicrobial peptide gene expression in tiger shrimp, *Penaeus monodon* in response to gram-positive bacterial probionts and white spot virus challenge. Aquaculture 316, 6–12. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.03.025

Ayé, A.M., Bonnin-Jusserand, M., Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Koffi Nevry, R., Rabah, N., Blache, Y., Molmeret, M., 2015. Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. Microbiology 161, 2039–2051. doi:10.1099/mic.0.000147

Bachère, E., Destoumieux, D., Bulet, P., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. Aquaculture 191, 71–88. doi:10.1016/S0044-8486(00)00419-1

Balcázar, J.L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol. 114, 173–186. doi:10.1016/j.vetmic.2006.01.009

Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A.C., Márquez, I., Gironés, O., Muzquiz, J.L., 2007a. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). Br. J. Nutr. 97, 522–527. doi:10.1017/S0007114507432986

Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T., Cunningham, D.P., 2007b. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. J. Invertebr. Pathol. 96, 147–150. doi:10.1016/j.jip.2007.04.008

Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Res. Vet. Sci. 115, 66–77. doi:10.1016/j.rvsc.2017.01.016

Burge, E.J., Madigan, D.J., Burnett, L.E., Burnett, K.G., 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. Fish Shellfish Immunol. 22, 327–39. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.004

Carbone, M., Irace, C., Costagliola, F., Castelluccio, F., Villani, G., Calado, G., Padula, V., Cimino, G., Lucas Cervera, J., Santamaria, R., Gavagnin, M., 2010. A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the *Azorean* nudibranch *Tambja ceutae*. Bioorganic Med. Chem. Lett. 20, 2668–2670. doi:10.1016/j.bmcl.2010.02.020

Carbonnelle, E., Grohs, P., Jacquier, H., Day, N., Tenza, S., Dewailly, A., Vissouarn, O., Rottman, M., Herrmann, J.L., Podglajen, I., Raskine, L., 2012. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. J. Microbiol. Methods 89, 133–136. doi:10.1016/j.mimet.2012.03.003

Carnevali, O., Maradonna, F., Gioacchini, G., 2017. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. Aquaculture 472, 144–155. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.037

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus*

acidilactici on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture 294, 306–313. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.06.016

Cavalcanti, B.C., Júnior, H.V.N., Seleghim, M.H.R., Berlinck, R.G.S., Cunha, G.M.A., Moraes, M.O., Pessoa, C., 2008. Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on Chinese hamster lung fibroblasts. Chem. Biol. Interact. 174, 155–162. doi:10.1016/j.cbi.2008.05.029

Chai, P.C., Song, X.L., Chen, G.F., Xu, H., Huang, J., 2016. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of Litopenaeus vannamei against white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol. doi:10.1016/j.fsi.2016.05.011

Dawood, M.A.O., Koshio, S., 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. Aquaculture 454, 243–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.12.033

de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Goarant, C., Goyard, E., Mugnier, C., Fievet, J., Piquemal, D., Bachère, E., 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. Mol. Immunol. 45, 3438–3445. doi:10.1016/j.molimm.2008.04.002

de Lorgeril, J., Saulnier, D., Janech, M.G., Gueguen, Y., Bachère, E., 2005. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. Physiol. Genomics 21, 174–183. doi:10.1152/physiolgenomics.00281.2004

Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachère, E., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. J. Cell Sci. 113 (Pt 3, 461–469. doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.010

Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U., Von Döhren, H., 2005. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). Appl. Microbiol. Biotechnol. 67, 539–548. doi:10.1007/s00253-004-1812-2

Dufourcq, R., Chalkiadakis, E., Fauchon, M., Deslandes, E., Kerjean, V., Chanteau, S., Petit, E., Guezennec, J., Dupont-Rouzeyrol, M., 2014. Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine costal environment from New Caledonia. Lett. Appl. Microbiol. 58, 102–8. doi:10.1111/lam.12162

Emami, K., Askari, V., Ullrich, M., Mohinudeen, K., Anil, A.C., Khandeparker, L., Burgess, J.G., Mesbahi, E., 2012. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS One 7, e38515. doi:10.1371/journal.pone.0038515

Emami, K., Nelson, A., Hack, E., Zhang, J., Green, D.H., Caldwell, G.S., Mesbahi, E., 2016. MALDI-TOF mass spectrometry discriminates known species and marine environmental isolates of *Pseudoalteromonas*. Front. Microbiol. 7, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2016.00104

Fagutao, F.F., Yasuike, M., Santos, M.D., Ruangpan, L., Sangrunggruang, K., Tassanakajon, A., Takahashi, Y., Ueno, R., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., 2009. Differential gene expression in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following administration of oxytetracycline and oxolinic acid. Dev. Comp. Immunol. 33, 1088–92. doi:10.1016/j.dci.2009.05.010

Fall, J., Kono, T., Tanekhy, M., Itami, T., Sakai, M., 2010. Expression of innate immune-related genes of Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, after challenge with *Vibrio nigripulchritudo*. African J. Microbiol. Res. 4, 2426–2433.

Franco, R., Arenal, A., Santiesteban, D., Sotolongo, J., Pimentel, E., Carrillo, O., Bossier, P., Faculty, A.S., Habana, L., Engineering, F.B., 2016. *Psychrobacter* sp. 17-1 enhances growth and survival in early postlarvae of white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, 1931 (Decapoda, Penaeidae). Crustaceana 89, 1467–1484. doi:10.1163/15685403-00003595

Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., de Decker, S., Saulnier, D., le Roux, F., 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. Syst. Appl. Microbiol. 29, 570–80. doi:10.1016/j.syapm.2005.12.005

Gomez-Gil, B., Tron-Mayén, L., Roque, A., Turnbull, J.F., Inglis, V., Guerra-Flores, A.L., 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture 163, 1–9. doi:10.1016/S0044-8486(98)00162-8

Goncalves, P., Guertler, C., Bachère, E., de Souza, C.R.B., Rosa, R.D., Perazzolo, L.M., 2014. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. Dev. Comp. Immunol. 42, 294–301. doi:10.1016/j.dci.2013.09.017

Goulden, E.F., Hall, M.R., Pereg, L.L., Høj, L., 2012. Identification of an antagonistic probiotic combination protecting ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) larvae against *Vibrio owensii* infection. PLoS One 7. doi:10.1371/journal.pone.0039667

Holmström, C., 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents 30.

Holmström, C., Kjelleberg, S., 1999. Marine *Speudoalteromonas* species are associated with higter organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microb. Ecol. 30, 285–293. doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00656.x

Holmström, C., Mccloy, S., 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS Microbiol. Ecol. 41.

Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. J. Fish Dis. 25, 633–642. doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x

Kautsky, N., Rönnbäck, P., Tedengren, M., Troell, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture 191, 145–161. doi:10.1016/S0044-8486(00)00424-5

Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.L., Robert, R., 2012. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). Aquaculture 344–349, 29–34. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.02.029

Kim, S.W., Nho, S.W., Im, S.P., Lee, J.S., Jung, J.W., Lazarte, J.M.S., Kim, J., Lee, W.-J., Lee, J.-H., Jung, T.S., 2017. Rapid MALDI biotyper-based identification and cluster analysis of *Streptococcus iniae* . J. Microbiol. 55, 260–266. doi:10.1007/s12275-017-6472-x

Kongnum, K., Hongpattarakere, T., 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish Shellfish Immunol. 32, 170–177. doi:10.1016/j.fsi.2011.11.008

Lazado, C.C., Caipang, C.M.A., Estante, E.G., 2015. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. Fish Shellfish Immunol. 45, 2–12. doi:10.1016/j.fsi.2015.02.023

Leyton, Y., Sayes, C., Mejias, C., Abarca, M., Wilson, R., Riquelme, C., 2017. Increased larval survival of *Seriola lalandi* using *Pseudoalteromonas* sp. as probiotics. Rev. Biol. Mar.

Oceanogr. 52, 95–101. doi:10.4067/S0718-19572017000100007
Leyva-Madrigal, K.Y., Luna-González, A., Escobedo-Bonilla, C.M., Fierro-Coronado, J.A., Maldonado-Mendoza, I.E., 2011. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. Aquaculture 322–323, 16–22. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.09.033
Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191, 209–245. doi:10.1016/S0044-8486(00)00429-4
Liu, K.-F., Chiu, C.-H., Shiu, Y.-L., Cheng, W., Liu, C.-H., 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish Shellfish Immunol. 28, 837–44. doi:10.1016/j.fsi.2010.01.012
Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
Luis-Villaseñor, I.E., Macías-Rodríguez, M.E., Gómez-Gil, B., Ascencio-Valle, F., Campa-Córdova, Á.I., 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 321, 136–144. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.08.036
Maeda, M., Shibata, A., Biswas, G., Korenaga, H., Kono, T., Itami, T., Sakai, M., 2013. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) Intestine and Assessment of Immunomodulatory Role of a Selected Strain as Probiotic. Mar. Biotechnol. 16, 181–192. doi:10.1007/s10126-013-9532-1
Mai, W., Wang, W., 2010. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. Fish Shellfish Immunol. 28, 727–33. doi:10.1016/j.fsi.2010.01.002
Mohamed, K., Megahed, M.E., Ali, M.A.M., 2017. Effect of dietary supplementation of Agrimos® on growth performance, feed utilization and immunological parameters of *Macrobrachium rosenbergii* juveniles. Aquac. Int. 1441–1452. doi:10.1007/s10499-017-0123-4
Morya, V.K., Choi, W., Kim, E.K., 2014. Isolation and characterization of *Pseudoalteromonas* sp from fermented Korean food, as an antagonist to *Vibrio harveyi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 1389–1395. doi:10.1007/s00253-013-4937-3
Mugnier, C., Soyez, C., 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. Aquaculture 244, 315–322. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.11.010
Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., Bachère, E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. Eur. J. Biochem. 269, 2678–2689. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x
Neu, A.K., Månsson, M., Gram, L., Prol-García, M.J., 2014. Toxicity of bioactive and probiotic marine bacteria and their secondary metabolites in *artemia* sp. and *caenorhabditis elegans* as eukaryotic model organisms. Appl. Environ. Microbiol. 80, 146–153. doi:10.1128/AEM.02717-13
Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., Vuthiphandchai, V., 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white

shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Vet. Microbiol. 159, 443–450. doi:10.1016/j.vetmic.2012.04.029

Offret, C., Desriac, F., Le Chevalier, P., Mounier, J., J??gou, C., Fleury, Y., 2016. Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and ecological significance. Mar. Drugs 14. doi:10.3390/md14070129

Palacios, E., Racotta, I.S., 2007. Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. Aquaculture 268, 123–135. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.034

Péqueux, A., 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. J. Crustac. Biol. 15, 1–60.

Perazzolo, L.M., Bachère, E., Rosa, R.D., Goncalves, P., Andreatta, E.R., Daffre, S., Barracco, M.A., 2011. Alpha2-macroglobulin from an Atlantic shrimp: Biochemical characterization, sub-cellular localization and gene expression upon fungal challenge. Fish Shellfish Immunol. 31, 938–943. doi:10.1016/j.fsi.2011.08.011

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, 45e–45. doi:10.1093/nar/29.9.e45

Pham, D., Ansquer, D., Chevalier, A., Dauga, C.C., Peyramale, A., Wabete, N., Labreuche, Y., 2014. Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. Aquaculture 432, 475–482. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.031

Pham, D., Charmantier, G., Wabete, N., Boulo, V., Broutoi, F., Mailliez, J.R., Peignon, J.M., Charmantier-Daures, M., 2012. Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (*Decapoda*, *Penaeidae*). Aquaculture 362–363, 10–17. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.026

Ramírez, C.N.B., Rodrigues, M.S., Guimarães, A.M., Guertler, C., Rosa, J.R., Seiffert, W.Q., Andreatta, E.R., Vieira, F. do N., 2017. Effect of dietary supplementation with butyrate and probiotic on the survival of Pacific white shrimp after challenge with *Vibrio alginolyticus*. Rev. Bras. Zootec.

Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., Stern, S., 2007. Exposure to probiotics and β-1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. Aquaculture 273, 405–415. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.10.042

Sha, Y., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Qi, C., Wang, L., 2016. Bacterial population in intestines of *litopenaeus vannamei* fed different probiotics or probiotic supernatant. J. Microbiol. Biotechnol. 26, 1736–1745. doi:10.4014/jmb.1603.03078

Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., Tang, S., 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. Fish Shellfish Immunol. 34, 954–67. doi:10.1016/j.fsi.2012.09.021

Vaseeharan, B., Ramasamy, P., 2003. Control of pathogenic Vibrio spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treat- ment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol 36, 83–87.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 655–71. doi:10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000.Updated

Vieira, F. do N., Pedrotti, F.S., Buglione Neto, C., Mouriño, J.L.P., Beltrame, E., Martins, M., Ramirez, C., Alejandro, L., Arana, V., 2007. Lactic-acid bacteria increase the survival of

marine shrimp,. Brazilian J. Oceanogr. 55, 251–255.
Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., Massabuau, J.C., 2008. Life on the edge: Physiological problems in penaeid prawns *Litopenaeus stylirostris*, living on the low side of their thermopreferendum. Mar. Biol. 154, 403–412. doi:10.1007/s00227-008-0931-1
Wabete, N., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Massabuau, J.C., 2006. A soft technology to improve survival and reproductive performance of *Litopenaeus stylirostris* by counterbalancing physiological disturbances associated with handling stress. Aquaculture 260, 181–193. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.06.041
Wang, X.W., Wang, J.X., 2015. Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. Mol. Immunol. 68, 404–411. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.018
Wang, X.W., Xu, J.D., Zhao, X.F., Vasta, G.R., Wang, J.X., 2014. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. J. Biol. Chem. 289, 11779–11790. doi:10.1074/jbc.M114.552307
Yu, M., Wang, J., Tang, K., Shi, X., Wang, S., Zhu, W., Zhang, X., 2012. Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. Microbiology 158, 835–42. doi:10.1099/mic.0.055970-0
Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., Wang, X., Liufu, Z., 2011. Dietary administration of Bacillus (B. *licheniformis* and B. subtilis) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (*Decapoda*: *Penaeidae*). Aquac. Res. 42, 943–952. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02677.x
Zhang, S., Li, J., Wu, X., Zhong, W., Xian, J., Liao, S., Miao, Y., Wang, A., 2013. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 34, 1131–8. doi:10.1016/j.fsi.2013.01.016
Zheng, C.N., Wang, W., 2016. Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquac. Res. 2767–2777. doi:10.1111/are.13110
Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., Zhang, X.H., 2016. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. Aquaculture 451, 163–169. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.09.020
Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 252, 516–524. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.021
Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Balcazar, J.L., 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 36, 68–74. doi:10.1016/j.fsi.2013.10.007
Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 33, 683–9. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.027
Zorriehzahra, M.J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Lazado, C.C., 2016.

Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. Vet. Q. 2176, 1–14. doi:10.1080/01652176.2016.1172132

Partie 2.2 : Impact de NC201 lors d'un stress infectieux à *Vibrio nigripulchritudo* sur la réponse immunitaire et antioxydante de *L. stylirostris*

Dans ce travail, une attention particulière a été portée sur les animaux exposés à un stress infectieux. Le but étant de déterminer si l'administration de NC201 affecte la réponse immunitaire et la défense antioxydante chez la crevette, notamment si le traitement probiotique peut conférer une résistance différentielle ou une amélioration de l'état de santé comparativement à des animaux non traités au probiotique. Ainsi plusieurs biomarqueurs permettant l'évaluation de l'immunité et du stress antioxydant ont été analysés. Parmi ces marqueurs, la population des cellules immunitaires, les hémocytes, n'a pas été significativement affectée par les traitements.

L'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire a été quantifiée dans les hémocytes circulants de l'hémolymphe. Les activités enzymatiques et les niveaux d'expression des gènes associés à la réponse antioxydante ont été mesurés dans l'hépatopancréas des mêmes animaux.

Concernant le niveau d'expression des gènes liés à l'immunité dans les hémocytes, aucun effet significatif n'a été observé chez les animaux uniquement traités au probiotique. Le stress infectieux chez les animaux contrôles a provoqué une hausse significative de l'expression du facteur antilipopolysaccharide (ALF) et une baisse de la stylicine. Chez les animaux traités avec NC201, l'infection a provoqué une surexpression significative de la superoxyde dismutase (SOD) (à T4 et T24 post infection) alors que le traitement probiotique est responsable d'une baisse de l'expression de la transglutaminase et de l'ALF chez les animaux IP vs IC à T10 post infection. L'effet potentiel du probiotique sur l'immunité ne s'est pas manifesté par l'augmentation de l'expression des biomarqueurs testés sauf de la SOD. Ce manque de contraste pourrait être dû à un stress initial provoqué par le transfert et masquant les variations d'expression. Cependant des modulations de l'expression de plusieurs gènes ont été observées. Ainsi les effets observés chez les animaux contrôles infectés semblent décalés de 24 h chez les animaux probiotiques infectés. Cette dynamique coïncide avec à celle observée dans la point précédent (partie II-1) lors de l'observation de la présence de *Vibrio nigripulchritudo* dans l'hémolymphe, ratios faibles de *Vibrio* et NC201 dans l'hémolymphe dans les 24 h qui suivent l'infection. Ce phénomène pourrait également expliquer le recrutement plus lent des hémocytes sur le lieu d'infection principal et une prolifération hémocytaire retardée chez les animaux probiotiques. Il ne peut être exclu que les bactéries non présentes dans l'hémolymphe, notamment le *Vibrio,* soient dans un autre compartiment de l'animal.

Dans le cadre de l'étude des effecteurs de la balance pro/antioxydante, les seuls effets significatifs observés dans les hépatopancréas sont une augmentation du taux de glutathion total et de l'expression du gène de la SOD due à l'infection chez les animaux traités avec les probiotiques à T4 post infection. Il apparaît que le stress de transfert se traduit également par une augmentation de l'activité des enzymes de la réponse antioxydante. Ce stress affecte moins les animaux traités avec NC201. Ces animaux présentaient une activité plus faible des enzymes SOD, catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPX), alors que l'expression des gènes *SOD*, *GPX* et glutathion-S-transférase (*GST*) était stimulée ainsi que les taux de glutathion total (GSHT) et de protéines carbonylées (Carb).

Les modulations de l'expression et des activités des biomarqueurs de la réponse immunitaire et de la régulation du stress oxydant n'ont pas mis en évidence unimpact majeur de l'administration de NC201 sur la crevette. Cependant, il est apparu que la crevette acquière

une résistance ou un état physiologique qui lui confère un état de santé plus performant à l'égard de stress d'infection et de salinité. Le transfert initial des animaux ainsi que le stress de confinement pour l'infection, semblent être à l'origine de modulations de gènes qui sont moins perceptibles pour les animaux traités au probiotiques. Ces résultats suggèrent que les animaux traités au probiotique seraient moins sensibles au stress ce qui pourrait découler d'un état de santé plus performant. Ces impacts du stress initial sur la modulation des gènes ou de l'activité des enzymes peuvent être à l'origine du manque d'observation de modulations significativement différentes entre les groupes de traitement. De plus, pour des raisons expérimentales les animaux utilisés dans les expérimentions étaient à des stades de mue variés, alors qu'il aurait été préférable de choisir des animaux en intermue, plus stables physiologiquement. Néanmoins, la variabilité des biomarqueurs globalement plus faible chez les animaux traités avec le probiotique NC201 indique un impact bénéfique de la souche NC201 sur l'animal.
Les résultats issus des travaux effectués dans le cadre de l'étude de l'impact de NC201 sur la physiologie de l'animal vont être discutés dans cette partie à la vue des résultats obtenus lors de la caractérisation de NC201 ainsi que ceux concernant l'impact de NC201 sur la physiologie globale de *L*. *stylirostris*.

Ces travaux sont présentés dans la publication suivante :

Publication 4 :
L. Sorieul, V. Boulo, D. Ansquer, C. Zhang, C. Irvoas, M-M. Le Gall, D. Pham, N. Wabete « Immune response of blue shrimp Litopenaeus stylirostris treated with probiotic *Pseudoalteromonas sp*. NC201 following infection with *Vibrio nigripulchritudo* » (pour soumission à Fish and Shellfish Immunology, après la levée de la confidentialité d'Ifremer)

Ainsi que dans la partie traitant les résultats sur les mécanismes de réponse au stress oxydant intitulée :

L'administration de probiotique NC201 impacte les biomarqueurs impliqués dans la réponse au stress oxydant chez la crevette, *Litopenaeus stylirostris*, impact amplifié par *Vibrio nigripulchritudo*

Publication 4 : « Immune response of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* treated with probiotic *Pseudoalteromonas sp*. NC201 following infection with *Vibrio nigripulchritudo* »

Immune response of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* treated with probiotic *Pseudoalteromonas sp.* NC201 following infection with *Vibrio nigripulchritudo*

Louis Sorieul[1,2], Viviane Boulo[1], Dominique Ansquer[1], Cong Zhang[1], Cécile Irvoas[1], Le Gall Marie-Madeleine[1], Dominique Pham[1], Nelly Wabete[1].

[1] Ifremer, UR Lagon, Environnement et Aquaculture Durable, 101 Promenade Roger Laroque, BP32078, 98897 Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France
[2] Université de la Nouvelle-Calédonie, Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement, BPR4, 98851 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie, France

Keywords: *Litopenaeus stylirostris*, *Pseudoalteromonas*, probiotic, *Vibrio nigripulchritudo*, gene expression, immunity.

In preparation for submission to: Fish & Shellfish Immunology

Abstract

The effect of probiotic, *Pseudoalteromonas sp*. NC201, isolated from the New Caledonian marine environment, was studied on the immune gene expression in subadult pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). Animals were exposed since hatching to 10^5 cfu.mL^{-1} of probiotic administered every 48 h in the rearing water during 6 months. Immune gene expression was measured after challenge with *Vibrio nigripulchritudo,* pathogen of shrimp. The probiotic was responsible for increasing shrimp survival rates by 20% in infectious conditions. Neither probiotic administration nor infection had a significant effect on the total hemocyte count. The expression levels of the lipopolysaccharide and β-1.3-glucan binding protein (LGBP), serine protease (SerProt), prophenol oxidase (ProPO1), superoxide dismutase (SOD), transglutaminase (Tgase), stylicin, lysozyme (Lys), penaeidin 3 (Pen3), and anti-lipopolysaccharide factor (ALF) were determined through quantitative PCR. The SOD was significantly upregulated in probiotic animals by the infection 4 and 24 h post infection (NIP *vs* IP). The ALF was stimulated in control animals by the infection 4h post infection (NIC *vs* IC) but downregulated by the probiotic in infected animals 10 h post infection (IC *vs* IP). The stylicin was downregulated by the infection in control animals 4 h post infection (NIC *vs* IC). The clotting factor (Tgase) gene expression was downregulated by the probiotic in infected animals 10 h post infection (IC *vs* IP). For the other genes the modulations observed were not significant. These findings highlight the fact that, even though NC201 has a clear beneficial effect on *L. stylirostris*, this probiotic does not trigger an overall increase in immune related gene expression. Immune pathways react differently to NC201 administration and *V. nigripulchritudo* challenge which suggest a more specific probiotic mechanism.

Introduction

Worldwide aquaculture, and especially shrimp farming, has been affected by pathogenic outbreaks. Besides bacterial, viral and fungal infections a substantial part of the mortality reported in broodstock is due to poor environmental conditions, unbalanced nutrition and

genetic factors [1]. Most pathologies affecting shrimp farms are due to infectious agents such as viruses and bacteria [2]. Even with the recent increase of the impact of viral pathologies, vibriosis remains one of the major pathologies affecting the worldwide shrimp production [2,3]. In New Caledonia, the aquaculture of pacific blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, is affected by two seasonal vibriosis: the 93 syndrome due to *Vibrio penaeicida* [4,5] and summer syndrome due to *V. nigripulchritudo* [6,7].

The *Pseudoalteromonas* NC201 strain has already shown a probiotic effect on *L. stylirostris* larvae by an increased survival rate and development index [8]. The potential application for New Caledonian hatcheries led to a better characterization of the strain through biomolecular and biochemical methods (Sorieul et al. submitted - Article 2 of this manuscript). NC201 was initially selected for probiotic trials because of its antibacterial effect against *V. penaeicida* and *V. nigripulchritudo*. Initial observation showed that, after being administered in the rearing water, NC201 was able to enter the shrimp hemolymph but could not maintain itself as it disappeared from hemolymph after 48 h (Sorieul et al. submitted - Article 3 of this manuscript).

Immune response in crustacean is innate and takes mostly place in the hemolymph *via* the hemocytes and can either act directly against foreign agents by contact or indirectly by the secretion of antimicrobial molecules in the plasma [9]. The immune response relies on an initiation step triggered by non self-recognition through pathogen recognition receptors (PRR) [10] which lead to different reactions including phagocytosis, melanization and the release of antimicrobial peptides [11–13]. The melanization process is initiated by such PRR, the lipolysaccharide, typically found in the cell wall of Gram negative bacteria, binding protein (LGBP), which activates the serine protease (SerProt) transforming the prophenoloxidase (ProPO) into phenoloxidase (PO) [14,15]. Once excreted the ProPO leads to a non specific encapsulation of pathogens. Melanization is considered as a rapid and local response [15]. Another aspect of the local response to tissue damage or pathogen invasion is the clotting mechanisms, which is also promoted by PO activity [11,15]. This clotting is mediated by enzymes catalyzing the linkage of clottable proteins in the hemolymph such as the transglutaminases (Tgase) [16].

Phagocytosis is also triggered by pathogen recognition by the hemocytes and involves the internalization of the pathogen and its exposure to reactive oxygen species (ROS) [9]. These produced ROS are potentially harmful to the neighboring tissues and must therefore be degraded. Multiple enzymes with this role were identified in shrimp, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase and catalase [17–20].

A major role in shrimp humoral response is the synthesis of antimicrobial peptides (AMPs). The major AMPs are commune in crustaceans: the lysozyme [21], crustin [22], the antilipolysaccharide factor (ALF) [23,24]. Some AMPs were identified specifically in penaeid shrimp, the penaeidin [25] and the stylicin or cryptidin-like firstly described in *L. stylirostris* [26,27]. These small peptides are mainly produced in hemocytes and some as penaeidin are stored in granules [23,28], their release and production is triggered by PRR activation [29].

This study focuses on immune response in shrimps *L. stylirostris* treated with the probiotic NC201 and after biotic stress by infection with *V. nigripulchritudo.* The expression of nine genes, LGBP, SerProt, ProPO, SOD, Tgase, Stylicin, ALF, Pen3 and Lys, involved at different levels of the hemocyte immune response, was evaluated in the 24 hours after *V. nigripulchritudo* challenge, on shrimps treated or not with probiotic. The relative expression of all related immune genes, excepted *Pen3*, was higher in the control animal than in the animals treated with probiotic but then modulations were observed. In order to understand

this effect on the shrimp ability to withstand pathogenic challenge the animal immune response has to be investigated.

Method

Animals

The *L. stylirostris* shrimp used in the experiments were reared at the Experimental Station of Saint-Vincent (Boulouparis, New Caledonia). The breeders were stocked for 8 months in outdoor earthen ponds before transfer to the hatchery. Nauplii and post-larvae were obtained according to the protocol of Pham et al. (2012). The larvae were stocked in $2m^3$ cylindroconical tanks filled with $1m^3$, 5µm filtered seawater at a density of 180 larvae per liter the first day (D0). Immediately after hatching, the larvae production was split in two groups. One group was treated with probiotics (P) all their life, NC201 probiotic was administrated to a density of 10^5 cells.L^{-1} repeated at a 48 h rhythm. The second group was non treated and were used as a control (C) but were treated with erythromycin (2.5ppm) at D3 (day 3), D5, D7 and D9.
Water temperature was maintained at 29°C and salinity was 35ppt. Feeding started 24 h after stocking, microparticles and *Artemia salina* nauplii were added *ad libitum* all along the larval rearing period and 50% of the water was renewed at D9 and D11, then every day from D13. When they have reached post-larval stage 4 (D19), the animals were moved to $2m^3$ outdoor tanks at a density of 20 L^{-1} for 15 days. To obtain subadults of the C and P populations, post-larvae were kept in $2m^3$ tanks at a density of 2/L for 4 months until they reached 10g, then 1 L^{-1} from 10 to 15g for 2 additional months. During rearing in $2m^3$ tanks, water was renewed over 18 h every second day before the probiotic administration. Animals were fed *ad libitum* with commercial pellets twice a day.

Infection challenge

One day before challenge, 256 shrimps (15.1 ± 3.2g) of each control and probiotic groups were transferred from rearing tanks into 16 experimental tanks (8 tanks per group; n=32 animals/tank) filled with 200L of seawater filtered (5µm) and treated with UV. Four conditions were carried out: non infected control (NIC), infected control (IC), non infected probiotic (NIP) and infected probiotic (IP). The P animals received their probiotic treatment (10^5 cells.mL^{-1}) in the rearing tank the day before the transfer and 4 hours before pathogen infection in experimental tanks. The probiotic treatment (administration every 48 h) was maintained during the entire infectious experiment. Prior to infection the water volume of all tanks was lowered to 100L. Then *V. nigripulchritudo* strain (SFn135) was inoculated at a density of 3.10^5 cfu.mL^{-1} in water in 8 experimental tanks (4 per treatment group, C and P). After two hours of challenge the water is completely eliminated and the tanks were refilled with clean seawater. Mean temperature and salinity during infectious experiment were respectively 25°C and 34 ppt. Survival was monitored twice daily over 5 days post infection.
For the analysis of immune response, 10 shrimps (2-3 shrimps per tank) of each condition, NIC, IC, NIP, IP, were sampled before infection (T0) and at 4, 10 and 24 hours after the end of two hours challenge. The weight and the molt stage were noted for each animal sampled.

Sampling

Hemolymph (~250µl) was withdrawn from the ventral sinus cavity of individual shrimps. The samples were collected using a 23-gauge needle and 1mL syringe. Then 20µl hemolymph samples were immediately diluted in 60µL of Alsever anticoagulation buffer [31] with 4%

paraformaldehyde (3% PFA final concentration) and conserved on ice at 4°C for total hemocyte count. The rest of hemolymph (150µl) was diluted in an equal volume of pre-cooled trisodium citrate buffer 30 mM, 0.34 M sodium chloride, 1 mM EDTA, and centrifuged at 4000 rpm (10 min, 4°C) to pellet hemocytes for further analyses of immune gene expression. Samples were immediately frozen and stored at -80°C until assays were conducted.

Hemocyte count

Total hemocyte count (THC) was determined by flow cytometry (Accuri C6, Becton Dickinson and Company, Accuri cytometer, Ann Arbor, MI USA). The FSCH threshold was set at 3.10^5 to eliminate background noise. Cell count was done on 14µL at a flow rate of 14µL.min^{-1}. Final hemocyte count is expressed in number of cell.mL^{-1} of hemolymph.

RNA extraction and expression level of immune related genes

During the experiment on subadults (15g), samples of hemolymph were collected 0, 4, 10 and 24 h post infection (T0, T4, T10 and T24). The hemocytes obtained through centrifugation of hemolymph from 10 animals per treatment were lysed to total RNA extraction, using the RNeasy mini kit (QIAGEN) following the protocol of the manufacturer. RNA quantity, purity and integrity were verified by Nanodrop (A260/A280). The extracted total RNA (200ng) was linearized through incubation at 70°C during 5min then reverse transcripted. First, the complementary DNA (cDNA) was synthesized by a reverse transcriptase (2 h at 42°C) followed by an inactivation step of this enzyme (15min at 70°C). The reaction solution was composed by 1x reaction buffer, 1mM final concentration of dNTPs, 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Promega) and 1µM of oligo-dT primers in a final volume of 20µL.

Expression level of the genes involved in the melanization process, *LGBP*, *SerProt* and *ProPO1* (GenBank accession numbers AF473579, AY368151, AY723296.1, respectively); enzymatic response to stress SOD (oxidative stress) and Tgase (clotting) (GenBank accession numbers, CV699330, DQ005531, respectively), and antimicrobial peptides (AMP), *ALF*, *stylicin*, *Lys*, *Litsty pen3* (GenBank accession numbers, DQ010421, EU177435, CV699332 and AY351655, respectively), were measured by qPCR to determine the effect of probiotic administration and infectious stress. Real-time PCR primer sequences and targeted genes used are listed in table 1. The real-time PCR (qPCR) was performed on an Aria Mx (Agilent) for the experiments carried on subadults. Efficiencies of all primers were determined using previously described method [32] and the melting curves were used to verify the specificity of the amplification. The elongation factor 1-α gene (EF1, accession number AY117542.1) was used as the internal reference (normalizer). Each run included the cDNA control, negative controls (total RNA treated with DNase I), and blank controls (water). The relative expression of targeted genes to EF1-α for each animal and in each condition were calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [33]. Finally, the rate of relative expression was expressed according to the relative expression of shrimp control (NIC) at T0.

Statistical analysis

All the data in figures are presented as means ± standard errors of 10 animals sampled in 4 tanks. The raw data of relative expression was analyzed using the method described by Livak and Schmittgen (2001). An analysis of covariance (ANCOVA) was carried out on the complete dataset, including individual weights, total hemocytes count (THC), time, population, treatment and molt stage as explicative variables for the quantitative PCR data. The data obtained from the THC and the quantitative PCR analysis were also subjected to two way

analysis of variance (ANOVA), with time, treatment and population as explicative variables. Both ANCOVA and ANOVA, were followed by Tukey's test using Excel Stat. Differences were considered significant at $p<0.05$. Significant groups were noted with letters, observations characterized with multiple letters belong to all the designated groups.

Results

Survival

In infected groups, IC and IP, the first mortalities appeared at 45 h and 69 h post infection, respectively. A significant decrease of mortality was observed for the shrimp treated with probiotic compared to control 120 h post infection (19.5% ± 2.8 *vs* 45.9% ± 7.8; $p<0.05$).

Total hemocyte count

Total hemocyte count (THC) was around 10^7 cells.mL^{-1} of hemolymph whatever the groups (NIC, NIP, IC and IP), no significant difference was observed (Figure 1). However some variations of hemocyte number were noted according the groups. Without infection, the THC of control animals (NIC) was 1.25 10^7 cells.mL^{-1} at T0 and decreased from T4 to stabilize until T24 to 0.9 10^7 cells.mL^{-1}, while the THC of animals NIP was lower, 10^7 cells.mL^{-1} at T0, and a slight variation was observed until T24. Concerning infected animals, IC and IP, the profile of THC between T4 and T24 is different since a peak of THC was noted for IC animals at T10 whereas for IP animals THC tended to decrease until T24.

Relative expression of genes related to immunity in shrimp

The potential effect of molt stage, weight and THC on the gene expression levels was tested through ANCOVA in the non infected shrimps (NIC and NIP). As no significant effect was observed, these parameters were not considered in the statistical analysis of gene expression in hemocytes of 4 animals groups (NIC, NIP, IC and IP).

Gene expression in shrimps treated to probiotic, NC201

Relative expression levels of genes, *LGBP, SerProt, ProPO1, Tgase, SOD, Lys, ALF, Pen3* and *Stylicin* evaluated before the challenge with *Vibrio nigripulgritudo* (T0), and 4 h post probiotic administration in NIP group, did not show no significant difference between the groups NIC and NIP (Table 2). However an expression reduced level of 2 and 1.85 fold was obtained in treated animals for the genes *LGBP* and *Lys*, respectively. Furthermore, because difference was not significant at T0 for NIC and NIP animals, all data statistical analyses following were processed in an integrated way.

Gene expression in hemocytes of shrimps treated to probiotic, NC201, after infection with *V. nigripulchritudo*

Relative expression of *LGBP* gene, a recognition receptor

The expression levels of ***LGBP*** gene were not significantly affected either by the probiotic treatment or the infection, however some variations were observed (Figure 2A).

The *LGBP* expression remained relatively stable in control animal hemocytes (NIC) during the 24 hours of follow-up with a transient decrease at T10. The lower gene expression of *LGBP* measured at T0 in treated animal (NIP) was maintained at T4 compared to control animal (NIC), then the difference was reduced. The expression profiles of *LGBP* gene were similar in NIC and IC animals from T4 until T24, while as in the NIP and IP animals the expression profiles

were also similar and stable expression until T10, followed by an increased expression at T24 but higher in IP animals.

Relative expression of *SerProt* and *ProPO1* genes involved in melanization process

The relative level of ***SerProt*** transcript did not show any significant variation whatever the groups (NIC, NIP, IC and IP) *(*Figure 2B). However, in the 10 first hours an increasing difference in *SerProt* expression between NIC and NIP was observed as the transcript level of NIP animals decreased. The infection induced a transient lower expression at T4 post infection in control animals (IC) compared to NIC. The animals treated with probiotic showed a very similar evolution of their *SerProt* expression to those IP ones.

ProPO1 expression levels did not vary significantly, nevertheless it was increasingly lower over the experiment in NIP animals compared to control ones (NIC) which increased slightly until T10 (Figure 2C). At T4, the expression level of this gene was relatively similar for animals IC, NIP and IP. After infection, IC animals were characterized by an expression increase from T4 to T10 and a stabilization at T24 at the same level that in NIC animals. *ProPO* expressions of NIP and IP animals were very similar and didn't vary over 10 h of the experiment; a slight decrease was only observed at 24 h for NIP animals.

Relative expression of *SOD* and *Tgase* genes enzymes involved in stress response

The ***SOD*** expression profile for NIC animals showed an expression increase from T0 until T10 and a significant decrease at T24 whereas for NIP animals the expression profile did not vary significantly but showed a similar decrease at 24 h (Figure 3A). Whatever the sampling times (T4, T10 and T24), the *SOD* expression was not significantly different between NIC and IC animals; however, while a stable expression is recorded at T4 and T10, an increase is measured at T24 in infected animals. Concerning the *SOD* profile (T0 to T24) of animals treated with probiotic, a significant higher and similar level was measured at T4 and T24 following infection (IP) compared to NIP. The SOD expression in IP animals at these time points was also higher than infected controls (IC) whereas the T10 level was very similar resulting of a transient decrease in IP animals.

The ***Tgase*** expression profile for NIC animals showed an expression increase from T0 to T4 followed by a decrease until T24, coming back to a similar level to T0 (Figure 3B). The animals treated with probiotic (NIP) showed an overall stable *Tgase* expression with a slight drop at T10.

After infection, the *Tgase* expression in IC animals tended to increase to T10, then to decrease to T24. Whatever the sampling times (T4, T10 and T24), the *Tgase* expression was higher for IC animals although the increase was not significantly different from NIC animals. For IP animals, the *Tgase* expression was slightly higher than in NIP animals at T4 and T24 but not at T10. In addition, at T10, a significantly higher expression was measured in the IC animals compared to the IP animals. A similar trend was observed at T4, while at T24 this trend was reversed.

Relative expression of *Stylicin, ALF, Pen3 and Lys genes,* antimicrobial peptides

The ***stylicin*** expression profile for NIC animals showed a stable expression from T0 to T4, followed by a significant decrease from T4 to T24 (Figure 4A). The same expression profile, but at lower level, was observed in NIP animals. The *stylicin* expression levels at T24 were similar between these two groups (NIC and NIP). At T4, the expression level for IC animals was significantly lower than that of NIC animals. However, at T10 and T24, expression levels for IC animals tended to increase and were higher than those of NIC animals.

The *stylicin* expression profile for NIP animals showed also a stable expression from T0 to T4, followed by an expression decrease from T10 to T24. After infection, the *stylicin* expression

profile for IP animals was similar to that of NIP animals from T4 to T24. However the expression levels appeared slightly higher in the animals IP than in the NIP animals at T10 and T24. Moreover, at T4 the *stylicin* expression of IP animals was higher than that of IC animals, but this difference declined from T10 to T24.

Vibrio nigripulchritudo impacted the expression of *stylicin* as early as 4 h post infection and the expression decrease was higher in control animals not treated with probiotics, while at T10 and T24 post infection the levels of expression were little variable.

The ***ALF*** expression profile for NIC animals showed an expression decrease from T0 to T10 followed by an increase at T24 (Figure 4B). The same evolution is observed in NIP animals, but with a stable level between T4 and T10.

In comparison with NIC animals, a significant increase in *ALF* expression was measured 10 hours post infection in IC animals and the expression level remained high at T24.

Animals treated with probiotic (NIP and IP) showed the same *ALF* expression up to T10, and a slightly higher level was measured at T24 for the IP animals than that of NIP animals.

At T10, the *ALF* expression was significantly higher for IC animals than those of IP animals. This higher level of expression was also observed at T4 and T24.

The ALF expression was modulated following the infection with *Vibrio nigripulchritudo* as early as 10 h post infection for control animals (not treated with probiotics), but at 24 h post infection for the animals treated with probiotics. However, this expression modulation was lower at T24.

The ***Pen3*** expression profile in NIC animals showed an expression increase from T0 to T4, followed by a slight decrease at T10, the expression level was maintained at T24 (Figure 4C). In treated animals (NIP), the gene expression was similar to profile of NIC animals up to T10 but increased at T24.

The infection tended to increase *Pen3* expression from T4 to T24 in the IC animals but the transcript level was lower at T4, and became higher than those of NIC animals only at T24.

The expression levels in IP animals were lower than those of NIP animals at T4 and T24, the expression level was similar at T10.

Moreover, the *Pen3* expression levels tended to be lower for the IP animals compared to IC animals whatever the sampling time (T4, T10 and T24). Earlier after the infection (T4), the *Pen3* expression tended to decrease in IC and IP animals, independently of the probiotic treatment of animals, whereas later (T10 and T24) the expression tended to increase. However, the *Pen3* expression was only weakly modulated by infection with *Vibrio nigripulchritudo,* with a lower level of expression in the presence of the probiotic NC201 (in IP animals from T4 to T24).

The ***Lys*** expression profile appeared identical in non infected animals (NIC and NIP) over the experiment: increase from T0 to T4, slight decrease at T10 followed by an expression rise at T24 (Figure 4D). However the expression level remained lower when animals were treated with probiotic. At T4 post infection, a lower expression was observed in control animals (IC) comparatively to NIC animals, this expression in control animals (IC) tented to increase until T24, although expression variations were observed inside of each groups (NIC and IC). In animals treated with probiotic, at T4 post infection, an expression decrease was also observed comparatively to NIP animals. Whereas an expression increase was measured at T10, an expression decrease was noted at T24 in IP animals, but the difference was not significant.

Whatever the sampling time, the expression levels in IP animals remained lower than those of IC animals.

Discussion

Probiotics, as an alternative to antibiotic treatment, are increasingly studied for aquaculture application [34–36]. The efficiency of the marine strain *Pseudoalteromonas* NC201, isolated in New Caledonia, has been demonstrated in larval rearing of *Litopenaeus stylirostris* [8]. A probiotic treatment with the NC201 strain improved the physiological status of the blue shrimp, allowing them to better withstand stressful conditions such as hyposaline stress or bacterial infection (Sorieul et al., in prep. - Article 3 of this manuscript). In the present study we evaluated the effect of probiotic treatment with *Pseudoalteromonas* NC201 on the immune response of the blue shrimp *L. stylirostris* post pathogenic challenge with *Vibrio nigripulchritudo*, highly pathogen of juvenile and adult shrimps.

The probiotic treatment with NC201 strain led to a better survival to infectious conditions, as mortalities were significantly reduced by more than half at 5 days post infection. In previous work we have shown that the increased survival rates observed in presence of NC201 could be caused by a direct inhibition of *V. nigripulchritudo* by NC201 (Sorieul et al., in prep. - Article 3 of this manuscript). Indeed the pathogen and probiotic seemed mutually exclusive in the shrimp hemolymph. This effect could also be a consequence of stimulation by NC201 of the immune system in shrimp, leading to an accelerated pathogen clearance (Sorieul et al., in prep. - Article 3 of this manuscript).

The shrimp immune response mainly relies on hemocytes, which are involved in pathogen detection, phagocytosis and encapsulation as well as in the production and release of molecules with antibacterial activity [37]. To a certain extent, the total hemocyte count (THC) reflect the immune response status of the shrimps [38]. In our experiment, the evolution of THC was not affected significantly after probiotic treatment, however some variations were observed. Indeed, after the probiotic treatment, THC was lower in probiotic animals *vs* control animals (T0), however this difference was blurred within 24 hours or even reversed. These results suggest that the control animals may be more stressed by transfer and manipulation. In the literature, the effects of probiotic treatment on THC evolution were different according to studies. *Lactobacillus plantarum* administrated in a diet increased THC in shrimp after 6 days [39] but also led to its decrease from 24 h to 168 h [40]. Likewise, the administration in water of probiotic *Bacillus licheniformis*, during 40 days, stimulated the number of hemocytes in *L. vannamei* [41]. However, the administration of a probiotic *Bacillus subtilis* in diet did not affect THC of the white shrimp [42]. In *Macrobrachium rosenbergii,* the administration in water of the probiotic *Vibrio* NE17 did not affect THC whereas the administration in feed increased it [43]. Our results, in concordance with those of the literature concerning this variation of THC, could be explained by the absence of taking into account the moulting stage of the animals used in ours experiments. Indeed Le Moullac et al. (1997) showed that the THC measured in intermoult (stage C) was significantly lower than the THC values observed in postmoult (stage B) and in premoult (stage D), and that these variations of THC during the moult cycle were mainly related to the variations of hyaline cells representing about 80% of THC. It would have been interesting to make a sampling point at 48 h which corresponded to the day of probiotic treatment since that was administered every 2 days, to study the THC evolution and to confirm potentially the THC drop in animals treated with bacteria (NIP, IC and IP).

Ours results showed that the infection by immersion in water with the pathogenic strain, *V. nigripulchritudo,* did not induce significant difference of the THC either in the control and probiotic treated animals (IC and IP). However, in control shrimps, the THC was always higher in infected control *vs* control uninfected with a THC higher at T10, whereas in probiotic group,

only at T4, the THC increase was observed and followed by THC decreases at T10 and T24, in IP *vs* NIP animals. In recent experiments, Sorieul et al (in prep. - Article 3 of this manuscript) showed that 4 h post infection (T4), in hemolymph of infected control animals (IC) the pathogenic *Vibrio* represented more than 30% of total heterotroph flora (THF), whereas in hemolymph of infected probiotic animals (IP), *Vibrio* represented no more than 3% of THF. In IC animals the ratio of *Vibrio* tended to be stable whereas in IP animals, a ratio increase was noted at T24. Moreover, Munoz et al. (2002) demonstrated that experimental microbial infection induced great changes in hemocyte populations. In fact, following intramuscular injection of bacteria, the THC dropped until 12 h post injection, and increased rapidly in following 72 h, suggesting an immune response in 2 phases. During the first 12 h, hemocytes would migrate to infection sites, resulting in a decrease in the number of circulating hemocytes. In the second phase a process of intense cell proliferation would be established in the lymphoid organ which would lead to a THC increase [45–47]. Thus, in our experiments a similar phenomenon should be observed although probably shifted in time since the infection is carried out with *Vibrio* in water and not by injection, and moreover Munoz et al. (2002 and 2004) worked with others species of *Vibrio*. Our results suggest that in IC animals, a THC increase in hemolymph (T4 and T10) was in concordance with the *Vibrio* high ratio in hemolymph, which would be the infection main site, whereas in IP animals, the lower presence of *Vibrio* in hemoplymph let us think that the main infection site could be in others site, potentially due to NC201 treatment, which led to decrease THC in hemolymph from T10. At T24, the THC decrease in both IC and IP animals can also be attributed to the death of hemocytes [38,47] as well as to the toxicity related to the nigritoxin secreted by *V. nigripulchritudo* [48]. These results could also be reinforced by the suggestion of Burgents et al. (2005) and van de Braak et al. (2002) that the lymphoid organ of penaeid shrimp is an important location for bacteria hemocyte interactions, site not analyzed in our work. It would have been interesting to continue the analyses up to at least 48-72 h post infection, particularly because the first mortalities were observed at 45 h and 69 h post infection in IC and IP animals, respectively. Moreover, we cannot exclude the potential impact of molting stages on the variations of THC and thus on the infection [44,51] which could modulate our results. To this date in literature, no paper reported results on THC after probiotic treatment and bacterial challenge, particularly by immersion in water with pathogens. The probiotic treatment with NC201 strain could modulate the THC during infection but more analysis taking moult stage into account and hemocyte types (hyalinocyte, granular hemocyte) should be considered to bring more information.

The recognition protein, LGBP is involved in the detection of foreign organisms, more specifically Gram negative bacteria and trigger the immune response [52]. In our study, *LGBP* expression was not affected by the presence of the probiotic NC201 strain in hemolymph although some variations were observed; particularly the *LGBP* expression was 2 fold lower in animals treated with probiotic compared to controls without infectious stress at 4 h and 10 h post administration (T0 and T4). A higher *LGBP* expression in control animals (NIC) may be a consequence of stress associated with the transfer and manipulation of animals that may lead to disturbances of microbiota and physiology. Probiotic treated animals could have a more stable physiological status. Moreover, at T24 post infection which corresponds to 34 h post administration of probiotics, the expression of *LGBP* tends to increase in the NIP animals concomitantly with the lowering of level of NC201 in the hemolymph (Sorieul et al in prep- Article 3 of this manuscript). Indeed in this previous work, we have shown that NC201 strain represented more than 30% of total heterotroph flora (FHT) in hemolymph from 4 h post

treatment. However, despite the abundance of these Gram negative bacteria in hemolymph of NIP animals, the expression of *LGBP*, specifically recognizing the lipopolysaccharides of Gram negative bacteria, was not modulated in shrimps. In addition, independently of infection, *LGBP* expression is always higher in control animals than probiotic treated animals from T0 to T10, only at T24 an increase of 2 and 3.8 times is observed in animals IP *vs* IC and NIP, respectively. A higher expression in the infected control animals (IC) could be explained by the entry of *Vibrio* from 4 h post infection while in the animals treated probiotic the entry of *Vibrio* is later due to treatment of NC201 as shown by Sorieul et al (in prep- Article 3 of this manuscript). Indeed these authors show that in probiotic animals (IP) the *Vibrio* number increased significantly in the hemolymph only from 24 h post infection. Thus the expression of *LGBP* would not be affected by the probiotic NC201 but would be up regulated in the presence of *Vibrio nigripulchritudo*. In *L. stylirostris*, the NC201 probiotic treatment seems to improve the defense response to the challenge with *V. nigripulchritudo*. In Crustaceans, *LGBP* expression is mainly studied after injection of LPS or bacteria such as *Vibrio.* In *Marsupenaeus japonicus* and *Eriocheir sinensis*, after injection of LPS, *LGBP* mRNA was up-regulated in hemocytes at 12–48 h [53,54]. In the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *LGBP* expression increased 3–6 h after being injected with live *V. alginolyticus* and returned to the original value after 12 h [55]. Similar results were obtained in *Fenneropenaeus chinensis* after being injected with mixture of heat killed *V. alginolyticus* and *Staphylococcus aureus* [56]. The response can also be delayed to 24 h post infection, as observed in *Penaeus monodon* after *V. harveyi* challenge [57]. The differences in *LGPB* expression levels following infection observed with our results could be due to the infectious method as most studies use injection. Indeed, in Invertebrates and particularly in shrimps, the impact of an injection is sufficient to lead to a modulation of physiological parameters within a few hours following the injury [29].

The melanization pathway, also referred to as the prophenoloxidase (ProPO) pathway, is one of the major immune response towards pathogens. It is triggered by lipopolysaccharide (LPS) and β-1.3-glucan binding proteins by binding to the recognition proteins such as LGBP. The major enzyme, phenoloxidase (PO), is synthesized as an inactive precursor (ProPO) and its activation to an active enzyme (PO) is mediated by a cascade of clip domain serine proteinases (clip-SPs) [37,58]. In our study, none of the observed variations of the *SerProt* expression were significant. However, non infected animals treated with probiotic (NIP) showed a lower expression level of *SerProt* until T10 than the control NIC, as observed for *LGBP* gene. Moreover, a down-regulation 4 h post infection was observed in infected control (IC) vs NIC (2 times down) after challenge. After infection with *V. nigripulchritudo*, the major difference in *SerProt* expression was observed in the control animals infected (IC) at T4, a decrease of 2 times was measured comparatively to the expression in NIC animals. In addition, the *SerProt* expression in animal NIC remained higher up to T10. The clip-SPs can regroup serine proteases, and serine protease homologues which are involved in the PO activating cascade of insects and crustaceans. The final key ProPO activators are called prophenoloxidase activating enzymes (PPAEs) [59]. In this work, the targeted serine protease was a serine protease homologous to SP1 of *L. vannamei*, whose sequence is homologous to the PPAE1 of *P. monodon (*pmPPAE1). The *pmPPAE1* was down regulated during the early infectious stage in shrimps injected with *V. harveyi* [60]. In *L. vannamei*, *lvPPAE1* was also down regulated by *V. harveyi* but this level was selectively enhanced, due to hemocyte aggregation [61]. In contrast, Zokaeifar et al. (2014) observed an overexpression of *SerProt* in *L. vannamei* following the injection of a probiotic, *Bacillus subtilis*. In addition, the pmPPAE1, exhibited the highest amino acid sequence similarity to a crayfish PPAE which was unaffected by a Gram

negative bacteria, *Aeromonas hydrophila* [63]. In this work, earlier after the infection (T4), a down regulation was observed in IC animals but in contrast not in IP animals since the expression tended to increase until T10. These results suggest that probiotic NC201 could improve the response capacity of *L. stylirostris* to *Vibrio* pathogen. Moreover, the *SerProt* expression appeared unaffected by *Pseudoalteromonas* probiotic, NC201. The high level of *SerProt* in the control (NIC) could reinforce that the control animals were initially stressed comparatively to probiotic animals.

As observed for *SerProt* expression, the probiotic treated population (NIP) had an overall lower expression level of *ProPO1* than the control animals (NIC). Even if not significant, the expression in NIP animals progressively decreased over 24 h, time at which NC201 amount in the hemolymph was the lowest (Sorieul et al in prep- Article 3 of this manuscript). It seems that NC201 strain does not stimulate *ProPO* expression as seen in other studies on probiotics. Probiotic trials showed that *Lactobacillus plantarum* led to an increase of the expression level of ProPO in *L. vannamei*, 168 h post dietary administration [40]. In the mud crab, *Scylla paramamosain*, the expression of *ProPO* can be tripled by the injection of LPS, the increase starting to be significant after 6 h post injection [64]. In this present study, the infection with *V. nigripulchritudo* induced a transient lower expression at 4 h in IC animals, as observed for the *SerProt* expression, whereas an overexpression trend was observed in probiotic group (IP) only 24 hours post infection when the *Vibrio* ratio is higher and the NC201 ratio is lower (Sorieul et al in prep. – Article 3 of this manuscript). In the swimming crab, *Portunus trituberculatus*, the expression of *ProPO* was decreased by a challenge with *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* 3h post challenge, [65]. Thus, the probiotic NC201 seems to improve the physiological capacity of shrimps to limit the impact of abiotic (particularly transfer in these experiments) or biotic stress. A prestimulation of the ProPO system by increasing of the expression level of actors involved in this pathway could contribute to a weakening of animals. A supplementary time point (48 h) would probably have been useful to determine if the up-regulation was comforted in infected probiotic group, moreover because *LGBP* expression which is the recognition protein involved in this pathway was overexpressed at T24 in IP animals. These results would be all the more interesting as mortality in IP animals began at 69 h whereas in IC animals it was at 45 h post infection.

The clotting mechanism, in crustacean hemolymph, is an immediate response to tissue degradation and bacterial invasion, and involves the transglutaminase (Tgase) [37,58]. The Tgase is released from hemocytes immediately after detection of bacterial LPS and is not only responsible for clotting but also regulates the expression of other immune related genes [66]. In this study, none of *Tgase* expression modulations measured was significant. The probiotic treatment, meaning the NC201 presence in hemolymph from T0 (NIP) (Sorieul et al in prep. - Article 3 of this manuscript), did not stimulate the *Tgase* expression but in control animal (NIC) an expression increase was observed at T4; whereas the pathogen strain, *V. nigripulchritudo*, induced a *Tgase* overexpression in infected control animals (IP) with a maximum at T10 (2 fold factor). An up-regulation of expression seemed to begin 24 h post infection in animals treated with NC201 probably linked to an increase of *Vibrio* in hemolymph (Sorieul et al in prep. - Article 3 of this manuscript). These results suggest that the NC201 strain is not recognized as a target to destroy or that this marine bacterium is capable to escape the clotting mechanism. Knowing that the NIP animals are receiving treatment for 6 months, the physiological status in NIP animal could have been modified or/and improved. Thus, the hemolymph invasion by *Vibrio* would be delayed as shown by Sorieul et al (in prep. - Article 3 of this manuscript). The expression modulation in IP animal indicates that the low amount of *Vibrio* in hemolymph is

capable of triggering overexpression of the *Tgase* quickly after infection (T4), but is not sufficient to maintain the level of expression, only the massive arrival of *Vibrio* to T24 triggers overexpression again. The slightly lowering of hemocyte number, observed in our study, could also be responsible for this expression decrease at T10. The expression modulation in control animal (NIC) could still reflect their sensitivity to the higher stress. An upregulation of *Tgase* expression was also observed in *L. vannamei* exposed for 24 h to *V. harveyi* [67]. When exposed to an abiotic stress (nitrite) [68], the increase at 12 h was followed by a downregulation from 24 to 48 h. In contrast, the hemocytes of *Fenneropenaeus chinensis* did not show any significant modulation of *Tgase* expression after biotic stresses with *Staphylococcus aureus* [69].

In response to invading microorganisms, reactive oxygen species (ROS) are produced in phagocytic cells including hydrogen peroxide, superoxide ions and hydroxyl radicals [70,71]. These molecules are synthesized to degrade bacteria and the phenomena is called respiratory burst. Then, superoxide level increased as described in *L. vannamei* in response to *Vibrio* [72,73] and have to be regulated to avoid host cellular damages. Organism produces an enzyme, the superoxide dismutase which catalyses the dismutation of superoxide into hydrogen peroxide and oxygen. The increased *SOD* expression in cells indicates an increased oxidative stress. In this study, the SOD expression was lower for the probiotic treated animals (NIP) compared to control (NIC), until T10. This low level could be explained by an increased health status of NIP animals allowing for a quicker recovery from the initial stress due to the transfer whereas NIC animals needed 24 h for the equivalent recovery as observed for the others genes. The infection with *V. nigripulchritudo* was responsible for an upregulation of *SOD* expression levels in IP animals 4 h and 24 h post infection, with a transient decrease at T10; whereas in animals IC vs NIC an expression decrease (2 fold) was measured at T4, in contrast to the expression increase at T24. These results suggest that upon entry of *Vibrio* into the shrimp, ROS are produced that triggers the response involving SOD, the shrimps treated with probiotics appear more responsive than the controls. However, the decrease in expression observed at T10 could be explained by migration of hemocytes to infection sites for phagocytosis and aggregation of cells in a defense response [40,47], or as described above related to an insufficient quantity of *Vibrio*. The hemocyte migration could be concomitant to hemocyte proliferation contributing to replace the hemocytes lysed in response to the microbial infection as demonstrated by Munoz et al (2004). These newly synthetized hemocytes could be involved in the second increase of *SOD* expression and also for others genes such as the *Tgase*. An expression increase of *SOD* was generally observed following an infection with *Vibrio* [18,38,74]. However, Gómez-Anduro et al. (2012) found a slight decrease (1.27 fold) in the *cMnSOD* mRNA levels in hemocytes of *L. vannamei* 1 h post inoculation of LPS, and a significant increase (1.3 fold) after 6 h. Moreover, the dietary treatment with commercial probiotics, Bactocell®, also induced an enhancement of the total antioxidant status of *L. stylirostris* confronted to *V. nigripulchritudo* infection [76].

Antimicrobial peptides (AMPs) are commonly found in the hemolymph of shrimp as products of immune response, playing important roles in killing or clearing the pathogens [77]. Their enhanced production can be the result of the activation *via* pattern recognition receptors (PRRs). The AMP expression, stylicin, anti LPS factor (ALF), penaeidin 3 (Pen3) and lysozyme (Lys) was studied in this work.

Stylicin is an antimicrobial peptide first described in *L. stylirostris* and with bacteriostatic activity against the *Vibrio* species, particularly against *V. penaeicida* and *V. nigripulchritudo* [26], which has since been identified in other shrimp species [78]. In this study the probiotic

NC201 did not affect the *stylicin* expression; the transcript level was slightly lower than control (NIC) in the first 4 hours but was stabilized at the same level at T24. However, a progressive decrease was measured over 24 h in NIC and NIP animals. This suggests that the initial expression levels of *stylicin* were high and probably resulting from the transfer stress and his effects associated to biotic and abiotic factors, thus some opportunistic bacteria may undergo some changes or mutations under hemolymph stress [79]. Nevertheless this stress seemed to have lesser impact on the probiotic animals. The main significant effect on *stylicin* expression was observed in infected control animals with a significant down regulation 4 h post infection. This decrease, but not significant, was also observed in same animals for the expression of *SerProt*, *ProPO*, *SOD*, *ALF*, *Pen3* and *Lys*. This is generally observed following the migration of hemocytes in infection sites [47]. No further difference was noticed, the expression level of *stylicin* in animals was similar independently from infection status or probiotic treatment. However the expression levels were similar in NIC *vs* NIP and IC *vs* IP, for these last ones the expression levels are slightly higher. These results show that despite the presence of *Vibrio* in IC and IP animals, the stimulation of the expression of *stylicin* remains low at T24, it would be interesting to follow the expression of this gene after 24 h especially considering that the mortality occurred to 45 and 69 h post infection. These results are surprising considering the work carried out by de Lorgeril et al. (2005). Indeed, these authors demonstrated that the corresponding mRNA of *stylicin* was overexpressed at 24 h in hemocytes of *L. stylirostris* shrimp surviving an experimental infection with *V. penaeicidae*, but in our results a decrease was only observed in NIC *vs* IC animals 4 h post infection. In addition, their results showed that the Ls-Stylicin1 can bind to the cell surface components of Gram negative bacteria, which strongly suggest that LPS is one of the target molecules for the Ls-Stylicin1. Alternatively, Ls-Stylicin1 could facilitate the intracellular elimination of pathogens by phagocytes through a potential opsonic effect, based on its LPS-binding activity.

Antilipopolysaccharide factors, ALFs, owe their activity to the ability to bind the lipopolysaccharides (LPS) constituting the bacterial cell membrane [80]. The spectrum of the antimicrobial activity of ALFs covers a large number of Gram positive and Gram negative bacteria, filamentous fungi as well as enveloped viruses [80]. The *ALF* expression was not affect by the probiotic NC201, expression decreased similarly in control and probiotic groups in the first 4 hours and increase at T24. Following the infection with *V. nigripulchritudo* the *ALF* expression was significantly overexpressed 10 h post infection only in control animals (IC), this modulation was maintained at T24 but the expression level was slightly lower. However, for this gene as the *stylicin* expression at T4 an expression decrease was observed. A lower upregulation in animals treated with probiotic (IP) began 24 h post infection concomitantly to the *Vibrio* increase in hemolymph (Sorieul et al in prep. - Article 3 of this manuscript). For the NIC *vs* IP animals, these results suggest these expression modulations could be the result of migration followed to proliferation of hemocytes shown by Munoz et al (2002; 2004) allowing for a timing change. Indeed at T24, our results showed that the LPS of *V. nigripulchritudo* were probably recognized and the appropriated response triggered in IC animals. The absence of response in IP animals before T24 could be explained by the low presence of *V. nigripulchritudo* in hemolymph which could be in insufficient number to trigger a response involving ALF. In *Fenneropenaeus chinensis*, after infection with *Vibrio*, four different phases could be distinguished from the expression profile of *ALF*, (1) expression of *ALF* increased strikingly during the first 6 hours; (2) a slight decrease of *ALF* expression appeared at 12 hours; (3) the level of *ALF* mRNA was elevated again strongly at 24 hours; (4) 48 hours after challenge, the expression of *ALF* mRNA dropped again slightly and remained at a higher level [81].

Moreover, it has been reported in several shrimp species that *ALF* transcription is induced upon bacterial challenge [82–84].

Penaeidin 3 (Pen3) belong to, a unique family of antimicrobial peptides specific to shrimps, the penaeidin which have been isolated in some nine penaeid shrimp species [28,85]. Penaeidins display antifungal and antibacterial activity with a predominant activity against Gram positive bacteria [86,87] and agglutinating activity against *Vibrio* strains [45]. During our experiment no significant effect could be observed on the *Pen3* expression. Probiotic treatment did not have a direct impact on this peptide expression, as the level was similar between non infected control and probiotic animals until T10. The pathogenic *V. nigripulchritudo* led to a transient down regulation of *Pen3* expression 4 h post infection in the two groups (IC and IP). This down regulation was also observed 24 h post infection in infected probiotic animals (IP) but not in infected control (IC). These results suggest also that these *Pen* expression modulations in hemocytes were probably related to variations of circulating hemocytes number and the triggering of a proliferative process. The penaeidins are produced constitutively and stored in granular hemocytes [28] and also can play the role of opsonin to help to phagocytosis by hemocytes [47]. In *L. stylirostris*, the level of *Pen3* transcript is systematically reduced in dying animals after *V. penaeicida* challenge [24,27]. Whereas the expression was upregulated by exposure of *L. vannamei* to *V. harveyi* [67,74].

The proteolytic peptide lysozyme (Lys) is an antimicrobial peptide found in numerous marine organism [88] and has been described in shrimp for its antibacterial effect against *Vibrio* [46,89,90]. In our study, a high variability was observed in *Lys* expression of control animals (NIC) and no difference with infected control animals (IC). In infected probiotic animal (IP) an expression decrease was observed at T4 and T24 but the expression levels were lower than in control animals (NIC). De Lorgeril et al (2008) found that the abundance of *Lys* transcripts remained lower in the selected shrimp, surviving to infection to *V. penaeicida*. In *L. vannamei*, a significant downregulation of *Lys* was observed after challenge by immersion in water containing *V. parahaemolyticus* at 10^3cfu.mL^{-1} during the 48 h post infection while no significant difference was observed when challenged at 10^4cfu.mL^{-1} [91]. In our study, particularly for the control animals, our results suggest again that the stress could be responsible. In probiotic animal the expression remained low, at T4, the low expression could correspond to a migration of the hemocytes towards infection sites as much as to the low *Vibrio* count in the hemolymph. At T24, the more massive entry of *Vibrio* into the hemolymph did not appear to trigger the expression suggesting that the number of hemocytes is insufficient or that there are variations in the composition of the hemocyte population. In addition, the *Vibrio* could inhibit the expression of Lys *via* the nigritoxin which lead to the death of hemocytes by apoptosis (Labreuche et al., 2017).

Most of these immune response share the same pathogen recognition receptor (PRR) that will either be activated through LPS or β-1,3-glucan [11]. Some of these immune pathways act in conjunction and can stimulate each other, as is the case with transglutaminase [66]. This means that even just by triggering the expression of one of these genes multiple immune pathways can be more quickly mobilized for a response.

The overall effect of NC201 was trending towards lower expression levels of most immune genes studied. The potential "stimulation effect" of this probiotic strain on immune defense was not established. The probiotic treatment with the Gram negative strain of *Pseudoalteromonas* NC201, did not affect the immune gene expression directly. However its presence in hemolymph before experimental infection could have a direct impact on *Vibrio nigripulchritudo*. We previously observed that the proportion of *Vibrio* in hemolymph was

reduced in 10 h post infection, comparatively to infected control animal (Sorieul et al in prep. - Article 3 of this manuscript). The probiotic treated animals had a better health status that facilitated their reactivity against pathogen invasion. The up-regulation of *SOD* in probiotic group 4 hours after infection is probably the consequence of an efficient ROS production against pathogenic bacteria, limiting their proliferation in hemolymph. The transient stimulation of immune gene expression (*LGBP*, *Tgase*, *ALF*), observed in control animals at T4 or T10 after *Vibrio* challenge was often shifted at T24 in probiotic treated animals, when *Vibrio* are more numerous in the hemolymph and NC201 less. A longer time course (72 h) would have been useful to precisely determine how the animals treated with NC201 regulate their immune response, and succeed in better surviving to the *Vibrio* infection.

The pathways studied might also not be the most affected either by the infection or the probiotic, other pathways mediated by other recognition molecules, such as Toll receptors [92] or lectins [93], might be more affected by the treatments and lead to immune responses such as clotting cascades or apoptosis [37].

Shrimp handling also seemed to have an effect on shrimps. Transfer seemed to have stressed the animals enough to observe increased health parameters. This stress could be associated to abiotic and biotic factors such as modifications of microflora. A longer stabulation period in the tanks might help prevent this effect.

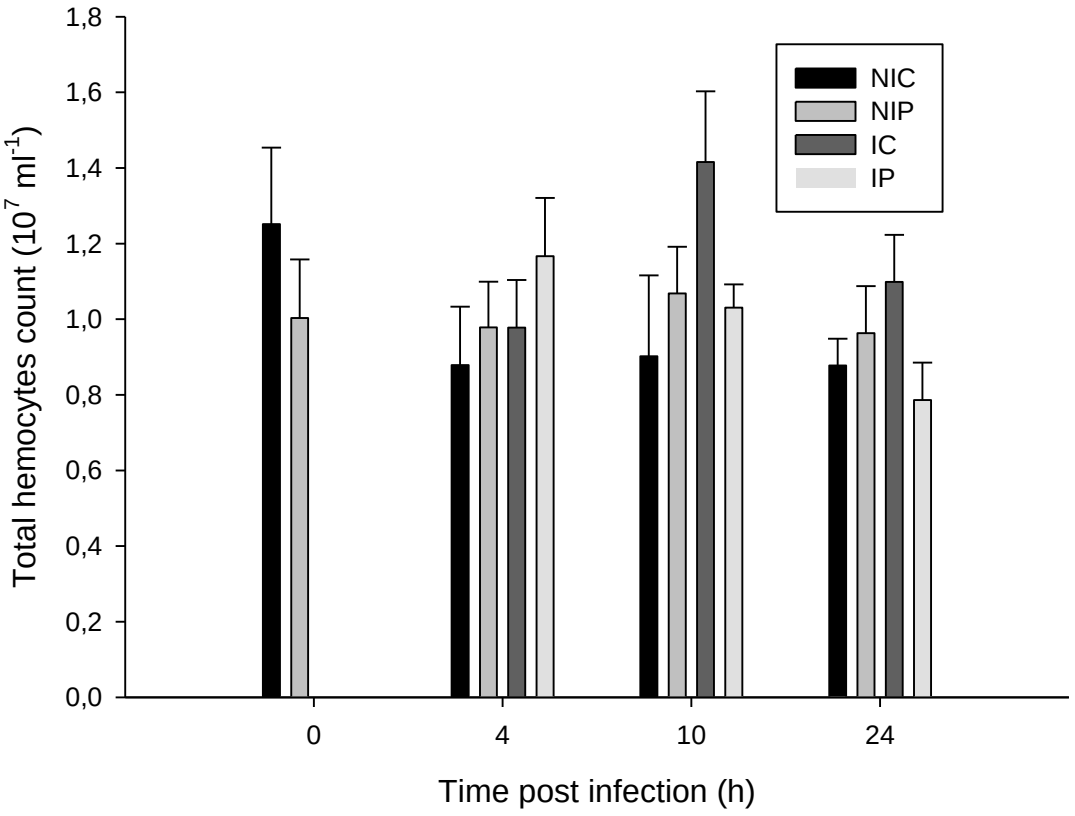


Figure 1: Total hemocyte count in hemolymph of *L. stylirostris* (15 g) using flow cytometry after infection with *V. nigripulchritudo*. Non infected control shrimp (NIC), non infected shrimp treated with probiotic (NIP), infected control shrimp (IC) and infected shrimp treated with probiotic (IP). Each value is the mean ± standard error of counts from 10 shrimps.

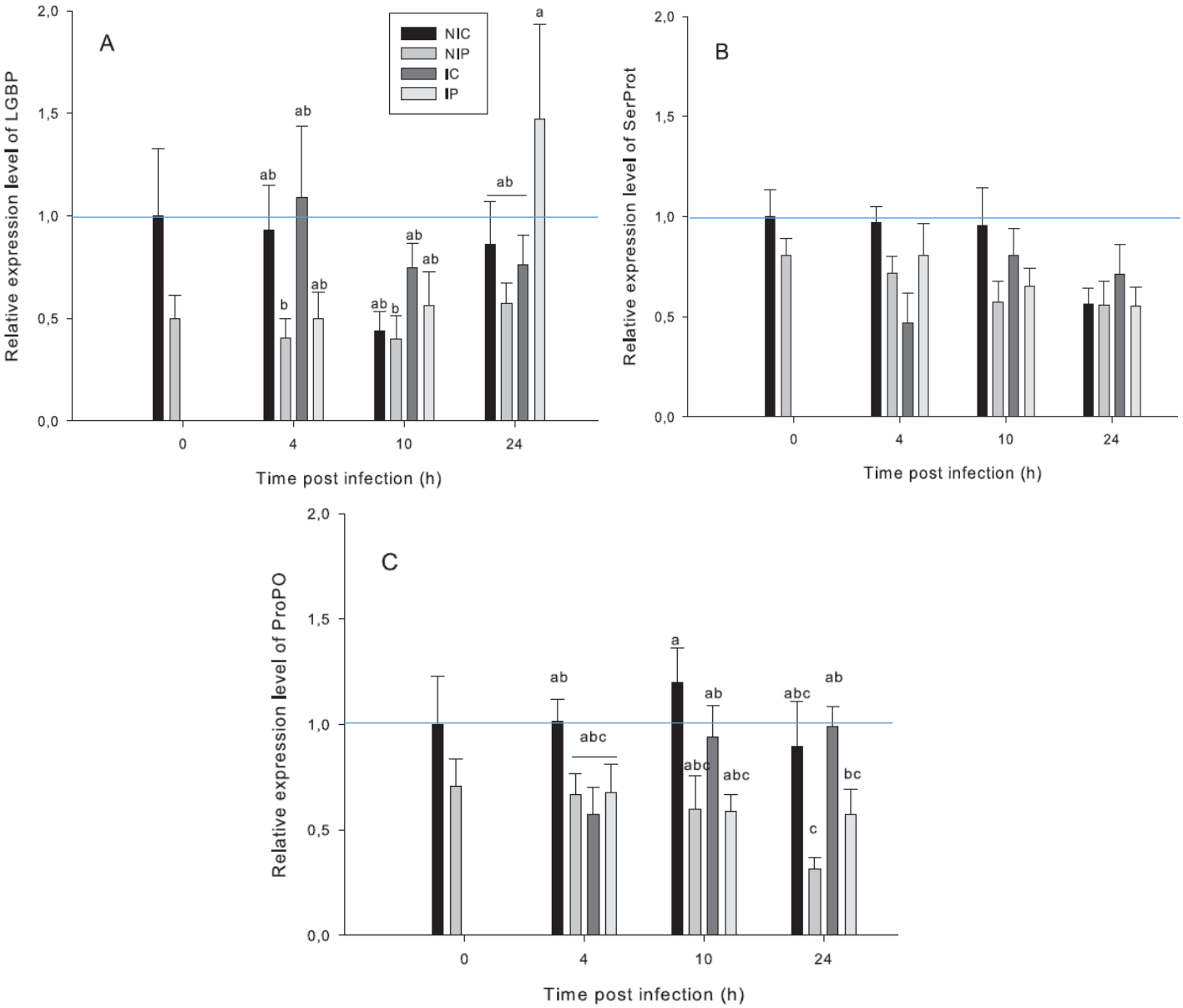


Figure 2: Expression ratio to control animals at T0 of (A) *LPS and β-1,3-glucan binding protein*, (B) *Serine protéase* and (C) *Prophenoloxidase1* in hemocytes of blue shrimp *L. stylirostris* (15 g), after infection with *V. nigripulchritudo*, (NIC) non infected control shrimp, (NIP) non infected shrimp treated with probiotic, (IC) infected control shrimp and (IP) infected shrimp treated with probiotic. Blue ligne indicates reference level (NIC, T0). Each value is the mean ± standard error (n = 10), significantly different values do not share any letters ($p < 0.05$).

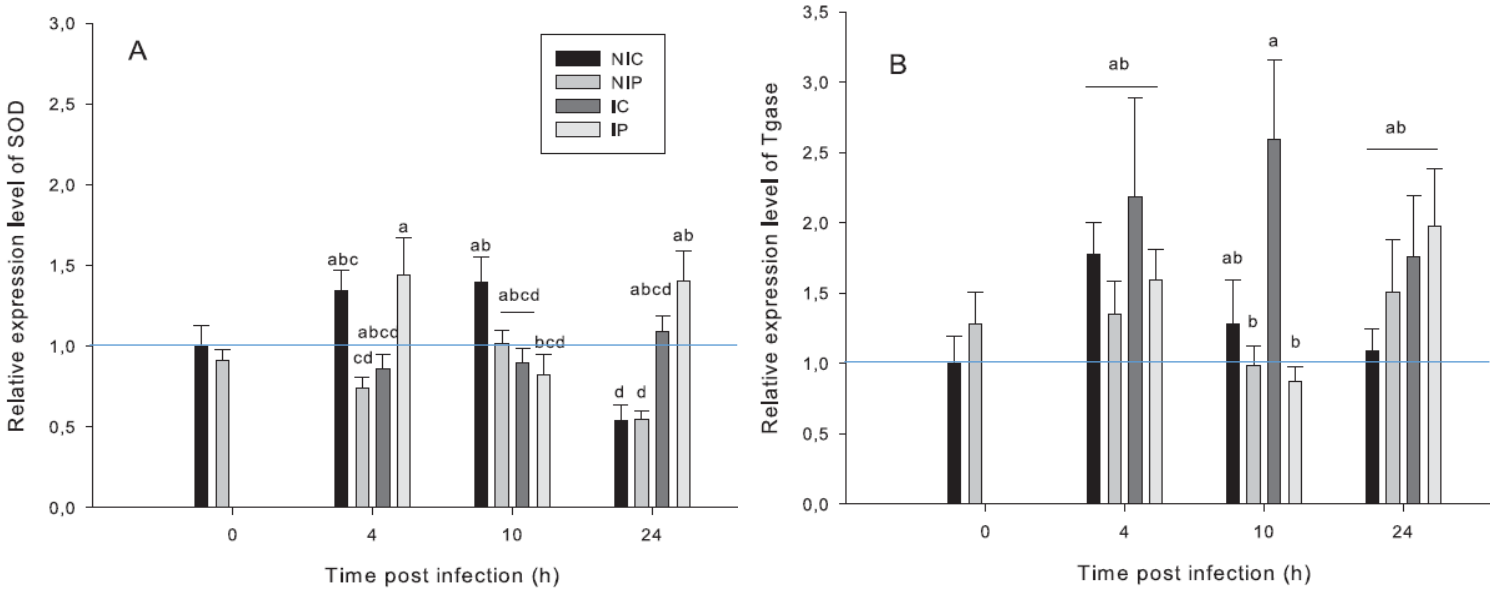


Figure 3: Expression ratio to control animals at T0 of (A) *Superoxide dismutase* and (B) *Transglutaminase* in hemocytes of blue shrimp *L. stylirostris* (15 g), after infection with *V. nigripulchritudo*, (NIC) non infected control shrimp, (NIP) non infected shrimp treated with probiotic, (IC) infected control shrimp and (IP) infected shrimp treated with probiotic. Blue ligne indicates reference level (NIC, T0). Each value is the mean ± standard error (n = 10), significantly different values do not share any letters ($p < 0.05$).

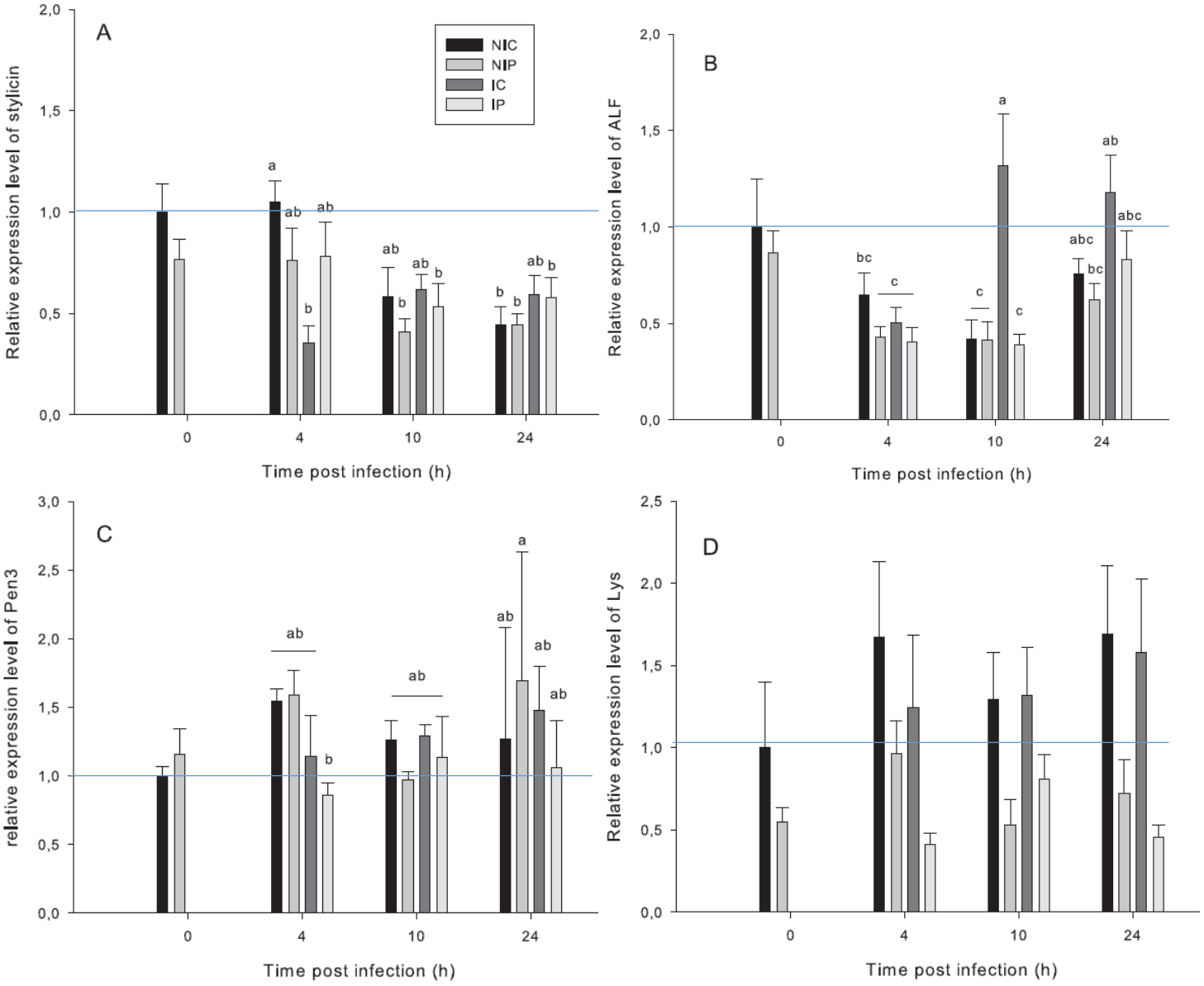


Figure 4: Expression ratio to control animals at T0 of (A) *Stylicin* (B) *Anti-LPS factor*, (C) *Penaeidin 3* and (D) *Lysozyme* in hemocytes of blue shrimp *L. stylirostris* (15 g), after infection with *V. nigripulchritudo*, (NIC) Non infected control shrimp, (NIP) non infected shrimp treated with probiotic, (IC) infected control shrimp and (IP) infected shrimp treated with probiotic. Blue ligne indicates reference level (NIC, T0). Each value is the mean ± standard error (n = 10), significantly different values do not share any letters ($p < 0.05$).

Table 1: Primers used for quantitative real-time PCR of immune related genes (*LGBP*, *SerProt*, *ProPO*, *Tgase*, *SOD*, *ALF*, *Stylicin*, *Penaeidin*, *Lysozyme*) and house-keeping genes (*EF-α*) in *Litopenaeus stylirostris*

Gene		Immune response	Forward primer (5' - 3') Reverse primer (5' - 3')	Reference
LGBP	LPS and glucan binding protein	pathogen detection /pattern recognition proteins (PRPs)	TGGATGTTGCCTCGTAACTG GAGTGCCAAAGTTGTCGTTG	This study
SerProt	Serine protease	melanization	ACAACACTCGTGTGCGTTTC CACACAGGCAACACAAATCC	This study
ProPO I	Prophenoloxidase 1	melanization	ACGCTCACAAGGAGGAAATG TGGAACAAGTCATCCACGAG	This study
Tgase	Transglutaminase	clotting	ATCAAGAGCATTGTCATCTGC TATCAGGCTTGTGAACCTCCA	Lorgeril et al. 2005 and 2008
SOD	Superoxide dismutase	degranulation and oxidative stress	ATCCACCACACAAAGCATCA AGGACTGGAATGATCCAAAGC	Cardona et al. 2014
ALF	Anti LPS factor	Antimicrobial peptide (AMP)	ATTGACCTCGTCGGCCACTC ATTTGCTGCGGGTGTTGGAC	This study
Cryptidin-like	Stylicin	AMP	GCCCTAAGTGCCCATATGA GCCGCATTCACATCCTATA	Lorgeril et al. 2005 and 2008
PEN3	Penaeidin 3	AMP	CCATGCGCCTCGTGGTCTG GAACGCGCTTGTAAGGTGGTAA	Lorgeril et al. 2005 and 2008
Lys	Lysozyme	AMP	GGCTTGGCACCAGGGTTACC CGTCTGCACGTCAGCTGTG	Lorgeril et al. 2005 and 2008
EF-α	Elongation factor	house keeping	TGCTCACATTGCCTGCAAGT CCTTACCAGTACGCCTGTCGAT	This study

Table 2: Initial relative expression level of immune related genes in non infected control (NIC) and non infected probiotic (NIP) animals. Each value is the mean ± standard error (n = 10).

	NIC	NIP
LGBP	1,79 ± 0,58	0,89 ± 0,20
SerProt	1,57 ± 0,21	1,26 ± 0,14
ProPO I	1,67 ± 0,38	1,18 ± 0,27
Tgase	0,81 ± 0,16	1,03 ± 0,19
SOD	1,13 ± 0,14	1,03 ± 0,09
Lys	1,49 ± 0,59	0,81 ± 0,23
ALF	1,78 ± 0,44	1,54 ± 0,20
PEN3	0,88 ± 0,06	1,02 ± 0,05
Stylicin	2,00 ± 0,27	1,53 ± 0,20

References

[1] N. Kautsky, P. Rönnbäck, M. Tedengren, M. Troell, Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming, Aquaculture. 191 (2000) 145–161. doi:10.1016/S0044-8486(00)00424-5.

[2] D. V. Lightner, R.M. Redman, C.R. Pantoja, K.F.J. Tang, B.L. Noble, P. Schofield, L.L. Mohney, L.M. Nunan, S.A. Navarro, Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas, J. Invertebr. Pathol. 110 (2012) 174–183. doi:10.1016/j.jip.2012.03.006.

[3] L. Tran, L. Nunan, R.M. Redman, L.L. Mohney, C.R. Pantoja, K. Fitzsimmons, D. V. Lightner, Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp, Dis. Aquat. Organ. 105 (2013) 45–55. doi:10.3354/dao02621.

[4] R. Costa, I. Mermoud, S. Koblavi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. Legroumellec, P. Grimont, Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia, Aquaculture. 164 (1998) 297–309. doi:10.1016/S0044-8486(98)00195-1.

[5] I. Mermoud, R. Costa, O. Ferré, C. Goarant, P. Haffner, “Syndrome 93” in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: History and description of three major outbreaks, Aquaculture. 164 (1998) 323–335. doi:10.1016/S0044-8486(98)00197-5.

[6] H. Lemonnier, A. Herbland, L. Salery, B. Soulard, “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow out ponds in New Caledonia: Zootechnical and environmental factors, Aquaculture. 261 (2006) 1039–1047. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.036.

[7] C. Goarant, D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert, S. De Decker, “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*, Aquaculture. 253 (2006) 105–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.031.

[8] D. Pham, D. Ansquer, A. Chevalier, C.C. Dauga, A. Peyramale, N. Wabete, Y. Labreuche, Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia, Aquaculture. 432 (2014) 475–482. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.031.

[9] E. Bachère, E. Mialhe, J. Rodriguez, Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications, Fish Shellfish Immunol. 5 (1995) 597–612. doi:10.1016/S1050-4648(95)80044-1.

[10] S. Young Lee, K. Söderhäll, Early events in crustacean innate immunity, Fish Shellfish Immunol. 12 (2002) 421–437. doi:10.1006/fsim.2002.0420.

[11] P. Jiravanichpaisal, B.L. Lee, K. Söderhäll, Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization, Immunobiology. 211 (2006) 213–236. doi:10.1016/j.imbio.2005.10.015.

[12] P. Jiravanichpaisal, S.Y. Lee, Y.-A. Kim, T. Andrén, I. Söderhäll, Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern, Dev. Comp. Immunol. 31 (2007) 441–455. doi:10.1016/j.dci.2006.08.002.

[13] C.J. Bayne, Non-Self Phagocytosis Phagocytosis appears to be an ancient line of defense in Invertebrate Recognition, Bioscience. 40 (1990) 723–731.

[14] P. Amparyup, W. Charoensapsri, A. Tassanakajon, Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens, Fish Shellfish Immunol. 34 (2013) 990–1001. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.019.
[15] L. Cerenius, B.L. Lee, K. Söderhäll, The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity, Trends Immunol. 29 (2008) 263–271. doi:10.1016/j.it.2008.02.009.
[16] M.Y. Chen, K.Y. Hu, C.C. Huang, Y.L. Song, More than one type of transglutaminase in invertebrates? A second type of transglutaminase is involved in shrimp coagulation, Dev. Comp. Immunol. 29 (2005) 1003–1016. doi:10.1016/j.dci.2005.03.012.
[17] G.A. Gómez-Anduro, C. V. Barillas-Mury, A.B. Peregrino-Uriarte, L. Gupta, T. Gollas-Galván, J. Hernández-López, G. Yepiz-Plascencia, The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression, Dev. Comp. Immunol. 30 (2006) 893–900. doi:10.1016/j.dci.2006.01.002.
[18] J. Tian, J. Chen, D. Jiang, S. Liao, A. Wang, Transcriptional regulation of extracellular copper zinc superoxide dismutase from white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* and WSSV infection, Fish Shellfish Immunol. 30 (2011) 234–240. doi:10.1016/j.fsi.2010.10.013.
[19] C.-H. Liu, M.-C. Tseng, W. Cheng, Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection., Fish Shellfish Immunol. 23 (2007) 34–45. doi:10.1016/j.fsi.2006.09.002.
[20] O.L. Tavares-Sánchez, G. a Gómez-Anduro, X. Felipe-Ortega, M. a Islas-Osuna, R.R. Sotelo-Mundo, C. Barillas-Mury, G. Yepiz-Plascencia, Catalase from the white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*: molecular cloning and protein detection., Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 138 (2004) 331–7. doi:10.1016/j.cbpc.2004.03.005.
[21] K. Somboonwiwat, P. Supungul, V. Rimphanitchayakit, A. Takashi, I. Hirono, A. Tassanakajon, Differentially Expressed Genes in Hemocytes of *Vibrio harveyi* -challenged Shrimp *Penaeus monodon*, J. Biochem. Mol. Biol. 39 (2006) 26–36.
[22] A. Tassanakajon, P. Amparyup, K. Somboonwiwat, P. Supungul, Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp, Mar. Biotechnol. 13 (2011) 639–657. doi:10.1007/s10126-011-9381-8.
[23] K. Somboonwiwat, M. Marcos, A. Tassanakajon, S. Klinbunga, A. Aumelas, B. Romestand, Y. Gueguen, H. Boze, G. Moulin, E. Bachère, Recombinant expression and anti-microbial activity of anti- lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*, Dev. Comp. Immunol. 29 (2005) 841–851. doi:10.1016/j.dci.2005.02.004.
[24] J. de Lorgeril, Y. Gueguen, C. Goarant, E. Goyard, C. Mugnier, J. Fievet, D. Piquemal, E. Bachère, A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a Vibrio infection, Mol. Immunol. 45 (2008) 3438–3445. doi:10.1016/j.molimm.2008.04.002.
[25] D. Destoumieux, P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodriguez, E. Bachère, Penaeidins , a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp Penaeus Penaeidins , a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp Penaeus vannamei (Decapoda), J. Biol. Chem. 272 (1997) 28398–28406. doi:10.1074/jbc.272.45.28398.
[26] J.L. Rolland, M. Abdelouahab, J. Dupont, F. Lefevre, E. Bachère, B. Romestand, Stylicins,

a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*, Mol. Immunol. 47 (2010) 1269–1277. doi:10.1016/j.molimm.2009.12.007.
[27] J. de Lorgeril, D. Saulnier, M.G. Janech, Y. Gueguen, E. Bachère, Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*., Physiol. Genomics. 21 (2005) 174–183. doi:10.1152/physiolgenomics.00281.2004.
[28] D. Destoumieux, M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps, E. Bachère, Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge., J. Cell Sci. 113 (Pt 3 (2000) 461–469. doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.010.
[29] E. Bachère, Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. De Lorgeril, J. Garnier, B. Romestand, Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*, Immunol. Rev. 198 (2004) 149–168. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x.
[30] D. Pham, G. Charmantier, N. Wabete, V. Boulo, F. Broutoi, J.R. Mailliez, J.M. Peignon, M. Charmantier-Daures, Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (*Decapoda*, *Penaeidae*), Aquaculture. 362–363 (2012) 10–17. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.026.
[31] J. Rodriguez, V. Boulo, E. Mialhe, E. Bachere, Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies., J. Cell Sci. 108 (Pt 3 (1995) 1043–1050.
[32] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Res. 29 (2001) 45e–45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
[33] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method, Methods. 25 (2001) 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
[34] A. Irianto, B. Austin, Probiotics in aquaculture, J. Fish Dis. 25 (2002) 633–642. doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x.
[35] B. Gomez-Gil, A. Roque, B. Lacuesta, G. Rotllant, Diversity of vibrios in the haemolymph of the spider crab *Maja brachydactyla*., J. Appl. Microbiol. 109 (2010) 918–26. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04718.x.
[36] G. Banerjee, A.K. Ray, The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries, Res. Vet. Sci. 115 (2017) 66–77. doi:10.1016/j.rvsc.2017.01.016.
[37] F. Li, J. Xiang, Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China., Dev. Comp. Immunol. 39 (2013) 11–26. doi:10.1016/j.dci.2012.03.016.
[38] P.F. Ji, C.L. Yao, Z.Y. Wang, Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection, Dis. Aquat. Organ. 96 (2011) 9–20. doi:10.3354/dao02373.
[39] K. Kongnum, T. Hongpattarakere, Effect of *Lactobacillus* plantarum isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*, Fish Shellfish Immunol. 32 (2012) 170–177. doi:10.1016/j.fsi.2011.11.008.
[40] C.-H. Chiu, Y.-K. Guu, C.-H. Liu, T.-M. Pan, W. Cheng, Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*., Fish Shellfish Immunol. 23 (2007) 364–77. doi:10.1016/j.fsi.2006.11.010.
[41] K. Li, T. Zheng, Y. Tian, F. Xi, J. Yuan, G. Zhang, H. Hong, Beneficial effects of *Bacillus*

licheniformis on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Biotechnol. Lett. 29 (2007) 525–530. doi:10.1007/s10529-006-9291-4.

[42] D.Y. Tseng, P.L. Ho, S.Y. Huang, S.C. Cheng, Y.L. Shiu, C.S. Chiu, C.H. Liu, Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, Fish Shellfish Immunol. 26 (2009) 339–344. doi:10.1016/j.fsi.2008.12.003.

[43] K.M. Mujeeb Rahiman, Y. Jesmi, A.P. Thomas, A.A. Mohamed Hatha, Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and Vibrio NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), Aquac. Res. 41 (2010). doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02473.x.

[44] G. Le Le Moullac, M. Le Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, P. Levy, Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis, Fish Shellfish Immunol. 7 (1997) 227–234. doi:10.1006/fsim.1996.0077.

[45] M. Muñoz, F. Vandenbulcke, D. Saulnier, E. Bachère, Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp, Eur. J. Biochem. 269 (2002) 2678–2689. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x.

[46] E.J. Burge, D.J. Madigan, L.E. Burnett, K.G. Burnett, Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*., Fish Shellfish Immunol. 22 (2007) 327–39. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.004.

[47] M. Muñoz, F. Vandenbulcke, J. Garnier, Y. Gueguen, P. Bulet, D. Saulnier, E. Bachère, Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic *vibrio*, Cell. Mol. Life Sci. 61 (2004) 961–972. doi:10.1007/s00018-003-3441-9.

[48] Y. Labreuche, J. Chenivesse, Sabine Alexandra, S. Le Panse, V. Boulo, D. Ansquer, S. Pagès, A. Givaudan, M. Czjzek, F. Le Roux, Nigritoxin, a novel bacterial toxin for crustaceans and insects (Tetraconata), Nat. Commun. (2017).

[49] J.E. Burgents, L.E. Burnett, E. V. Stabb, K.G. Burnett, Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Dev. Comp. Immunol. 29 (2005) 681–691. doi:10.1016/j.dci.2005.01.004.

[50] C.B.T. van de Braak, M.H. a. Botterblom, N. Taverne, W.B. van Muiswinkel, J.H.W.M. Rombout, W.P.W. van der Knaap, The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp, Fish Shellfish Immunol. 13 (2002) 293–309. doi:10.1006/fsim.2002.0409.

[51] C. Mugnier, C. Justou, H. Lemonnier, J. Patrois, D. Ansquer, C. Goarant, J.-R. Lecoz, Biological, physiological, immunological and nutritional assessment of farm-reared *Litopenaeus stylirostris* shrimp affected or unaffected by vibriosis, Aquaculture. 388–391 (2013) 105–114. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.01.010.

[52] X.-W.W. Wang, J.-X.X. Wang, Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections, Fish Shellfish Immunol. 34 (2013) 981–989. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.008.

[53] Y.C. Lin, B. Vaseeharan, J.C. Chen, Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide and ??-1,3-glucan binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*, Dev. Comp. Immunol. 32 (2008) 1260–1269. doi:10.1016/j.dci.2008.05.003.

[54] X. Zhang, Y.T. Zhu, X.J. Li, S.C. Wang, D. Li, W.W. Li, Q. Wang, Lipopolysaccharide and beta-1, 3-glucan binding protein (LGBP) stimulates prophenoloxidase activating system in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), Dev. Comp. Immunol. 61 (2016) 70–79. doi:10.1016/j.dci.2016.03.017.

[55] W. Cheng, C.-H. Liu, C.-H. Tsai, J.-C. Chen, Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*., Fish Shellfish Immunol. 18 (2005) 297–310. doi:10.1016/j.fsi.2004.08.002.

[56] F. Liu, F. Li, B. Dong, X. Wang, J. Xiang, Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition protein, lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein (LGBP) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*, Mol. Biol. Rep. 36 (2009) 471–477. doi:10.1007/s11033-007-9203-2.

[57] P. Amparyup, J. Sutthangkul, W. Charoensapsri, A. Tassanakajon, Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β-1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system, J. Biol. Chem. 287 (2012) 10060–10069. doi:10.1074/jbc.M111.294744.

[58] A. Tassanakajon, K. Somboonwiwat, P. Supungul, S. Tang, Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity., Fish Shellfish Immunol. 34 (2013) 954–67. doi:10.1016/j.fsi.2012.09.021.

[59] L. Cerenius, S. ichiro Kawabata, B.L. Lee, M. Nonaka, K. Söderhäll, Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity, Trends Biochem. Sci. 35 (2010) 575–583. doi:10.1016/j.tibs.2010.04.006.

[60] W. Charoensapsri, P. Amparyup, I. Hirono, T. Aoki, A. Tassanakajon, Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection, Dev. Comp. Immunol. 33 (2009) 811–820. doi:10.1016/j.dci.2009.01.006.

[61] I.-K. Jang, Z. Pang, J. Yu, S.-K. Kim, H.-C. Seo, Y.-R. Cho, Selectively enhanced expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, BMC Immunol. 12 (2011) 70. doi:10.1186/1471-2172-12-70.

[62] H. Zokaeifar, N. Babaei, C.R. Saad, M.S. Kamarudin, K. Sijam, J.L. Balcazar, Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Fish Shellfish Immunol. 36 (2014) 68–74. doi:10.1016/j.fsi.2013.10.007.

[63] H. Liu, P. Jiravanichpaisal, L. Cerenius, L.L. Bok, I. Söderhäll, K. Söderhäll, Phenoloxidase is an important component of the defense against Aeromonas hydrophila infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, J. Biol. Chem. 282 (2007) 33593–33598. doi:10.1074/jbc.M706113200.

[64] Q. Wu, S. Wang, C. You, Y. Li, Immune Response of Mud Crab, *Scylla Paramamosain*, to Bacterial Lipopolysaccharide, J. World Aquac. Soc. 47 (2016) 843–853. doi:10.1111/jwas.12300.

[65] X. Ren, J. Lv, B. Gao, J. Li, P. Liu, Immune response and antioxidant status of *Portunus trituberculatus* inoculated with pathogens, Fish Shellfish Immunol. 63 (2017) 322–333. doi:10.1016/j.fsi.2017.02.034.

[66] F.F. Fagutao, M.B.B. Maningas, H. Kondo, T. Aoki, I. Hirono, Transglutaminase regulates immune-related genes in shrimp, Fish Shellfish Immunol. 32 (2012) 711–715.

doi:10.1016/j.fsi.2012.01.018.
[67] K. Han-Ching Wang, C.-W. Tseng, H.-Y. Lin, I.-T. Chen, Y.-H. Chen, Y.-M. Chen, T.-Y. Chen, H.-L. Yang, RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*., Dev. Comp. Immunol. 34 (2010) 49–58. doi:10.1016/j.dci.2009.08.003.
[68] H. Guo, J.-A. Xian, A.-L. Wang, Analysis of digital gene expression profiling in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress, Fish Shellfish Immunol. 56 (2016) 1–11. doi:10.1016/j.fsi.2016.06.059.
[69] Y.C. Liu, F.H. Li, B. Wang, B. Dong, Q.L. Zhang, W. Luan, X.J. Zhang, J.H. Xiang, A transglutaminase from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), full-length cDNA cloning, tissue localization and expression profile after challenge, Fish Shellfish Immunol. 22 (2007) 576–588. doi:10.1016/j.fsi.2006.08.004.
[70] T. Holmblad, K. Söderhäll, Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity, Aquaculture. 172 (1999) 111–123. doi:10.1016/S0044-8486(98)00446-3.
[71] A.J. Nappi, E. Ottaviani, Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates, BioEssays. 22 (2000) 469–480.
[72] M. Muñoz, R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. Van Der Knaap, E. Mialhe, E. Bachère, Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*, Aquaculture. 191 (2000) 89–107. doi:10.1016/S0044-8486(00)00420-8.
[73] J. Li, B. Tan, K. Mai, Q. Ai, W. Zhang, Z. Liufu, W. Xu, Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, J. World Aquac. Soc. 39 (2008) 477–489. doi:10.1111/j.1749-7345.2008.00188.x.
[74] S. Nayak, S.K. Singh, N. Ramaiah, R.A. Sreepada, Identification of upregulated immune-related genes in *Vibrio harveyi* challenged *Penaeus monodon* postlarvae, Fish Shellfish Immunol. 29 (2010) 544–549. doi:10.1016/j.fsi.2010.05.010.
[75] G.A. Gómez-Anduro, F. Ascencio-Valle, A.B. Peregrino-Uriarte, A. Campa-Cordova, G. Yepiz-Plascencia, Cytosolic manganese superoxide dismutase genes from the white shrimp Litopenaeus vannamei are differentially expressed in response to lipopolysaccharides, white spot virus and during ontogeny, Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 162 (2012) 120–125. doi:10.1016/j.cbpb.2012.03.003.
[76] M. Castex, P. Lemaire, N. Wabete, L. Chim, Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge, Fish Shellfish Immunol. 28 (2010) 622–631. doi:10.1016/j.fsi.2009.12.024.
[77] E. Bachère, Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: Potential tools for disease control in larviculture, Aquaculture. 227 (2003) 427–438. doi:10.1016/S0044-8486(03)00521-0.
[78] H.T. Liu, J. Wang, Y. Mao, M. Liu, S.F. Niu, Y. Qiao, Y.Q. Su, C.Z. Wang, Z.P. Zheng, Identification and expression analysis of a novel stylicin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*), Fish Shellfish Immunol. 47 (2015) 817–823. doi:10.1016/j.fsi.2015.09.044.
[79] X.W. Wang, J.X. Wang, Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable, Mol. Immunol. 68 (2015) 404–411. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.018.

[80] R.D. Rosa, A. Vergnes, J. de Lorgeril, P. Goncalves, L.M. Perazzolo, L. Sauné, B. Romestand, J. Fievet, Y. Gueguen, E. Bachère, D. Destoumieux-Garzón, Functional Divergence in Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors (ALFs): From Recognition of Cell Wall Components to Antimicrobial Activity, PLoS One. 8 (2013) 17–19. doi:10.1371/journal.pone.0067937.

[81] F. Liu, Y. Liu, F. Li, B. Dong, J. Xiang, Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), Mar. Biotechnol. 7 (2005) 600–608. doi:10.1007/s10126-005-5006-4.

[82] E. de la Vega, N.A. O'Leary, J.E. Shockey, J. Robalino, C. Payne, C.L. Browdy, G.W. Warr, P.S. Gross, Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection, Mol. Immunol. 45 (2008) 1916–1925. doi:10.1016/j.molimm.2007.10.039.

[83] H. Nagoshi, H. Inagawa, K. Morii, H. Harada, C. Kohchi, T. Nishizawa, Y. Taniguchi, M. Uenobe, T. Honda, M. Kondoh, Y. Takahashi, G.I. Soma, Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*, Mol. Immunol. 43 (2006) 2061–2069. doi:10.1016/j.molimm.2005.12.009.

[84] P. Supungul, S. Klinbunga, R. Pichyangkura, I. Hirono, T. Aoki, A. Tassanakajon, Antimicrobial peptides discovered in the Black Tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach, Dis. Aquat. Organ. 61 (2004) 123–135. doi:10.3354/dao061123.

[85] Y. Gueguen, J. Garnier, L. Robert, M.P. Lefranc, I. Mougenot, J. De Lorgeril, M. Janech, P.S. Gross, G.W. Warr, B. Cuthbertson, M.A. Barracco, P. Bulet, A. Aumelas, Y. Yang, D. Bo, J. Xiang, A. Tassanakajon, D. Piquemal, E. Bachère, PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature, Dev. Comp. Immunol. 30 (2006) 283–288. doi:10.1016/j.dci.2005.04.003.

[86] E. Bachère, D. Destoumieux, P. Bulet, Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity, Aquaculture. 191 (2000) 71–88. doi:10.1016/S0044-8486(00)00419-1.

[87] L. Li, J.-X. Wang, X.-F. Zhao, C.-J. Kang, N. Liu, J.-H. Xiang, F.-H. Li, S. Sueda, H. Kondo, High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in Pichia pastoris., Protein Expr. Purif. 39 (2005) 144–151. doi:10.1016/j.pep.2004.09.006.

[88] H. Li, M.G. Parisi, M. Toubiana, M. Cammarata, P. Roch, Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses, Fish Shellfish Immunol. 25 (2008) 143–152. doi:10.1016/j.fsi.2008.04.001.

[89] A. Tyagi, R. Khushiramani, I. Karunasagar, I. Karunasagar, Antivibrio activity of recombinant lysozyme expressed from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, Aquaculture. 272 (2007) 246–253. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.08.055.

[90] E. de la Vega, A. García-Galaz, M.E. Díaz-Cinco, R.R. Sotelo-Mundo, A. García-Galaz, M.E. Díaz-Cinco, R.R. Sotelo-Mundo, White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio cholerae*, Fish Shellfish Immunol. 20 (2006) 405–408. doi:10.1016/j.fsi.2005.06.005.

[91] X.P. Hong, D. Xu, Y. Zhuo, H.Q. Liu, L.Q. Lu, Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*

(Boone), J. Fish Dis. 39 (2016) 1085–1097. doi:10.1111/jfd.12441.
[92] C. Yang, J. Zhang, F. Li, H. Ma, Q. Zhang, T. a Jose Priya, X. Zhang, J. Xiang, A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection., Fish Shellfish Immunol. 24 (2008) 564–74. doi:10.1016/j.fsi.2007.12.012.
[93] a K. Dhar, a Dettori, M.M. Roux, K.R. Klimpel, B. Read, Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White spot syndrome virus by cDNA microarrays., Arch. Virol. 148 (2003) 2381–96. doi:10.1007/s00705-003-0172-z.

Résultats supplémentaires : L'administration de probiotique NC201 impacte les biomarqueurs impliqués dans la réponse au stress oxydant chez la crevette, *Litopenaeus stylirostris*, impact amplifié par *Vibrio nigripulchritudo*

Introduction

Dans le cadre d'une infection par un pathogène, un mécanisme de défense cellulaire consiste à produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'anion superoxyde ($^1O_2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ion hydroxyl (OH^-), afin de détruire les agents infectieux. Cette voie, burst respiratoire, est notamment utilisée dans les hémocytes, les ROS sont alors stockés dans des granules, et utilisés dans la phagocytose chez les crustacés (Bachère et al., 1995). Ces ROS sont également produits lors du métabolisme aérobie des cellules, et peuvent donc être générés lors d'épisodes de stress stimulant une dépense énergétique. Cependant une exposition prolongée à ces ROS peut provoquer des lésions aux cellules de l'hôte, il est donc nécessaire pour la crevette de pouvoir éliminer ces composés. Certaines molécules, comme le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C) ou le béta carotène (vitamine A), mais aussi des enzymes telles la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxidase (GPX) et la glutathion S transférase (GST) ont un rôle de maintien de l'homéostasie cellulaire chez les animaux supérieurs (Aruoma et al., 1997). La SOD convertit les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène, ce peroxyde peut être ensuite transformé en eau et en dioxygène par la CAT ou la GPX (Nordberg and Arnér, 2001). Le glutathion, molécule à fort pouvoir réducteur, est impliqué dans la réduction des peroxydes (H_2O_2 comme R-OOH). Ces réactions de réduction peuvent être favorisées et catalysées par les enzymes GPX et GST. Le glutathion réduit, GSH, passe à une forme oxydée GSSG par dimérisation *via* un pont disulfure. Il s'agit d'une molécule effectrice clé de la réponse antioxydante et sa concentration totale donne une indication sur le potentiel de résistance à un stress oxydant alors que la concentration en GSSG témoigne de l'activité de la réponse antioxydante. Un défaut de capacité de régulation des ROS peut induire des dommages cellulaires tels que des mutations de l'ADN, l'oxydation des lipides membranaires et des protéines constitutives. Les molécules issues de ces réactions d'oxydation sont alors des indicateurs d'un état de stress oxydant persistant.

L'hépatopancréas est un organe important dans la réponse immunitaire humorale chez les crevettes. En effet, l'hépatopancréas et les branchies sont décrits comme les tissus principalement impliqués dans l'élimination des pathogènes chez les crustacés (Alday-Sanz et al., 2002; Gross et al., 2001; Parrilla-Taylor et al., 2013).

La capacité de la crevette à gérer une infection avec la bactérie pathogène *Vibrio nigripulchritudo*, *via* la réponse oxydante et la gestion des ROS produits, a ainsi été étudiée afin de déterminer l'influence du traitement probiotique NC201. La modulation de différents biomarqueurs de la capacité antioxydante a été mesurée dans l'hépoatopancréas des crevettes : les taux de glutathion réduit et oxydé, l'activité des enzymes dites antioxydantes ainsi que l'expression relative de leur gène (SOD, CAT, GPX, GST), et les quantités de 2 produits d'oxydation, le malondialdehyde (lipide) et protéines carbonylées.

Matériels et méthodes

Animaux et échantillonnages

Les échantillons d'hépatopancréas ont été prélevés lors de l'expérimentation précédemment décrite, sur les mêmes animaux que ceux prélevés en hémolymphe pour l'étude de la réponse immunitaire rapportée par Sorieul et al. (in prep - article 4 de cette thèse). Quatre groupes d'animaux ont été étudiés : les animaux témoins non infectés sans traitement probiotique (NIC), les animaux non infectés traités avec NC201 (NIP), les animaux infectés témoins (IC) et les animaux infectés traités au probiotique (IP). Des prélèvements d'hépatopancréas ont été réalisés sur 10 animaux de chaque groupe à différents temps : T0 (soit 4h après traitement au probiotique NC201 et avant l'infection avec *V. nigripulchritudo*), T4 et T24 soit 4h et 24h après l'infection.
Les hépatopancréas ont été prélevés et répartis en 2 tubes différents pour les différentes analyses. La portion de tissu nécessaire pour l'analyse de l'expression des gènes a été conservée dans du RNA later (1/2 hépatopancréas dans 500µL) à -20°C. Les échantillons prévus pour les analyses de biochimie ont été congelés par immersion immédiate dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Préparation des échantillons

Les hépatopancréas des crevettes ont été décongelés et broyés à froid dans 4ml du tampon de TRIS (Trizma base 10Mm, DTPA 1mM, Pmsf 1mM) à l'aide d'un vibro-broyeur (POLYTRON® PT1300D) pendant 1 min à 30 000 rpm. Après centrifugation (10min à 4000rpm, 4°C), une partie du surnageant a été conservée à -80°C pour l'analyse ultérieure des protéines, du glutathion, du malondialadéhyde (MDA), et des protéines carbonylées. La seconde partie du surnageant a subi 3 cycles de congélation/décongélation lysant les cellules avant d'être centrifugée (20min, 13 000rpm, 4°C). Le surnageant a été conservé à -80°C pour l'évaluation ultérieure des protéines et des activités enzymatiques de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GPX). L'ensemble des analyses biochimiques ont été adaptées en microplaques et réalisées avec le lecteur de microplaque Biotek-SynergyH1.
Les protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe coloré entre le Bleu Brillant G et les protéines en solution, entraînant un changement d'absorbance à 595nm fonction de la concentration en protéine.

Glutathion total et oxydé

Le glutathion total (GSHT) et oxydé (GSSG) ont été mesurés par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Coutelle et al. (1992). La réaction, rapide et spécifique, est basée sur la réaction du groupement thiol du glutathion avec l'acide 5,5ditio-2-nitrobenzoïque, après action de la glutathion réductase et en présence de NADPH. Le glutathion oxydé est mesuré après blocage du glutathion réduit par la 2 vinyl-pyridine. Les concentrations de GSHT et GSSG sont exprimées en nmol par mg de protéine.

Activités enzymatiques de SOD, CAT et GPX

L'activité de la SOD est mesurée selon la méthode de Marklund et Marklund (1974), basée sur l'auto-oxydation du pyrogallol. En solution basique, le pyrogallol en présence d'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) à pH 7,9-9,1 subit une auto-oxydation, teintant une solution à l'origine incolore en violet. Cette réaction est inhibée jusqu'à 90% par la superoxyde dismutase qui en dismutant l'anion superoxide (O_2^-) empêche l'oxydation du pyrogallol. L'absorbance à 405nm est mesurée en microplaque 96 puits. L'activité de la SOD est exprimée en U/mg de protéine, une unité enzymatique correspondant à la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% de l'oxydation du pyrogallol dans les conditions du dosage.

L'activité de la CAT est mesurée par spectrophotométrie en UV (240 nm) selon la méthode de Aebi (1984). Le principe est basé sur la mesure de la diminution d'absorbance due à la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène en présence de l'enzyme. Cette diminution d'absorbance est mesurée en microplaque pendant 1 minute sur un mélange réactionnel contenant 10µl d'échantillon et H_2O_2 à 6.6mM dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7,0). Pour chaque échantillon, un contrôle sans H_2O_2 est réalisé. L'absorbance à 240nm est mesurée en microplaque 96 puits, transparente aux rayons ultraviolets. L'activité de la catalase (CAT) est exprimée en micromoles de H_2O_2 décomposées par minute et mg de protéine.

L'activité de la GPX est mesurée selon la méthode de Günzler et al. (1974). Le principe du dosage repose sur le couplage de réactions enzymatiques faisant intervenir la GPX et la glutathion réductase (GSSG-R). La glutathion peroxydase réduit un hydroperoxyde (tBOOH) tandis que le glutathion est oxydé (GSSG). Le glutathion oxydé est ensuite réduit par la glutathion peroxydase en présence de NADPH, H+

$$2GSH + tBOOH \xrightarrow{GPX} GSSG + tBOH + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSSG-R} 2GSH + NADP^+$$

Le dosage est basé sur la mesure de la quantité de glutathion oxydé par le terbutyl en suivant la décroissance d'absorption du NADPH à 340nm. La vitesse de cette réaction correspond à l'activité de la GPX qui est exprimée en mU par mg de protéine. Une unité équivaut à la quantité (µmol) de $NAPH_2$ oxydé en une minute à 25°C.

Niveaux d'oxydation cellulaire : malondialdéhyde et protéines carbonylées

Le niveau de MDA (dialdéhydes maloniques) est dosé selon la méthode des TBARS (substances réactives avec l'acide thiobarbiturique) décrite par Draper et Hadley (1990). La mesure repose sur une libération par hydrolyse en milieu acide à 95°C du MDA qui réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose. La quantification spécifique des complexes formés est réalisée par fluorimétrie (532/553nm). Le niveau de MDA est exprimé en nmol par mg de protéine.

Le dosage des protéines carbonylées est basé sur la réaction du 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) avec les groupements carbonyls formant des 2,4- dinitrophenylhydrazones de couleur jaune (méthode de Levine et al., 1994). Après centrifugation, les surnageants des échantillons sont incubés pendant 1 heure dans 10nM de DNPH préalablement dissout dans 2mM de HCl, permettant la fixation du DNPH aux groupements carbonyls (fixation mole à mole). L'ajout de TCA (tri-choloro acétate) en concentration importante (20%) permet de précipiter toutes les protéines (y compris celles fixées au DNPH). Après centrifugation, le surnageant est éliminé, et le culot repris dans une solution de guanidine hydrocholorée, celle-ci se colorant en jaune spécifiquement avec le produit de la réaction de la DNPH avec les protéines carbonylées. La quantité de protéines carbonylées est finalement déterminée par la lecture de l'absorbance à 370 nm et exprimée en nmol par mg de protéines.

Mesure de l'expression relative des gènes *SOD*, *Cat*, *GPX* et *GST*

Les hépatopancréas (poids moyen 0.3g) préalablement décongelés ont été transférés et broyés dans le tampon de lyse (et incubés au bain marie, 37°C, 10 min). Les ARNs totaux ont ensuite été extraits selon la procédure décrite par le fournisseur dans le kit QIAGEN « RNeasy mini kit ». Les ARNs totaux extraits ont été quantifiés au nanodrop (NanoDrop 1000 - Thermo scientific). Après extraction, les ARNs totaux (200ng) ont été soumis à une étape de transcription inverse après avoir été préalablement linéarisés (70°C, 5min). Cette réaction se

décompose en deux phases : une phase de synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN grâce à une transcriptase inverse (2h, 42°C) puis une phase d'inactivation de l'enzyme (15 min, 70°C). Les réactions de qPCR ont été réalisées dans un volume final de 12.5µL comprenant 2µL d'ADNc dilué, de QuantiTect® SYBR Green PCR master mix (QIAGEN) et de 300nM d'amorces du gène cible. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 1. L'amplification est effectuée sur un appareil ARIA Mx Real Time PCR System (Agilent, Santa Clara, USA). Pour chaque gène cible, une gamme étalon constituée d'un pool d'ADNc de tous les échantillons a été réalisée avec des dilutions successives (1/4 à 1/64) afin de tester l'efficacité des couples d'amorces. Les échantillons d'ADNc ont été dilués au 1/8 pour les analyses en qPCR. L'expression relative des gènes cibles a été déterminée selon la méthode décrite dans l'article de Livak et Schmittgen (2001) et normalisée par rapport au gène de référence, EF1-α.

Résultats/Discussion

Variations des biomarqueurs du stress oxydant dans l'hépatopancréas d'animaux traités avec le probiotique, NC201

L'activité des enzymes associées à la réponse antioxydante (SOD, CAT, GPX) et l'expression relative de leur gène (*SOD, Cat, GPX* et *GST*), ainsi que la quantification des marqueurs de l'activité antioxydante (GSH total et GSSG) et des produits de la dégradation oxydative (Carb et MDA), ont été évalués chez les animaux NIC et NIP à T0, soit 4h post administration de NC201 (animaux NIP) et avant le challenge par *Vibrio nigripulchritudo.* Le niveau de glutathion total (GSHT), l'activité enzymatique de GPX et l'expression relative du gène de la *GST* se sont avérés significativement différents à T0 entre les groupes NIC et NIP (Tableau 2). A 4h post traitement probiotique, une quantité 10 fois supérieure de GSHT ainsi qu'un niveau de transcrits de la GST 2,29 fois supérieur étaient mesurés chez les animaux NIP *vs* NIC, alors qu'une activité enzymatique de la GPX était 0,58 fois supérieure chez les animaux NIC *vs* NIP. De ce fait, les analyses statistiques évaluant l'effet de l'infection sur ces biomarqueurs (GSHT, GST et GPX), ont été réalisées indépendamment pour les groupes contrôles (C) et les animaux traités probiotiques (P) (Figures 1, 4 et 5). L'analyse statistique des autres biomarqueurs a intégré l'ensemble des données chez les animaux contrôles (C) et les animaux traités avec le probiotique (P).

Estimation de la capacité antioxydante des animaux traités avec le probiotique NC201, après infection par Vibrio nigripulchritudo, par la mesure des variations des biomarqueurs dans l'hépatopancréas

La concentration en glutathion total (GSHT) a augmenté de T0 à T24 chez les animaux contrôle (NIC) pour atteindre un niveau similaire aux animaux NIP (Figure 1A) pour lesquels le niveau était resté relativement stable. La concentration en glutathion total initialement plus faible chez les animaux contrôle (T0) indique un état de stress plus important, et son augmentation progressive au cours des 24h peut être associée à de la néosynthèse à partir d'acides aminés (cystéine, glutamate et glycine). La quantité de GSHT plus élevée à T0 chez les animaux probiotiques par rapport aux témoins concorde avec une capacité de résistance aux stress plus importante, comme observé chez *L. stylirostris* en biofloc (Cardona et al., 2016). L'infection à *V. nigripulchritudo* a induit une augmentation du GSHT, dans les 2 groupes (IC et IP), légère à T4 mais significative 24h post infection. Le niveau de GSHT apparaissait plus élevé

chez les animaux IP que chez les animaux IC à T4 et T24. Le stress infectieux induirait donc une stimulation de néosynthèse de glutathion à partir de T24. Cette néosynthèse, ATP dépendante (Lu, 2014), semble plus importante chez les animaux traités au probiotique NC201 et pourrait être la conséquence d'un état physiologique amélioré, permettant à ces animaux traités probiotique d'augmenter leur résistance ou tolérance vis-à-vis du *Vibrio* pathogène. Cette meilleure résistance ou tolérance à l'infection est observée par un retard à la mortalité chez les animaux IP *vs* IC et un taux de mortalité à 6 jours post infection inférieur dans les animaux IP (Sorieul et al., in prep - article 3 de ce manuscrit).

Le taux de glutathion oxydé (GSSG) chez les animaux contrôle NIC a augmenté faiblement de T0 à T24, alors que chez les animaux traités (NIP) une augmentation à T4 a été suivie d'une diminution à T24 (Figure 1B). Ces variations n'étaient cependant pas significatives. Chez les animaux non infectés, un niveau plus élevé a été observé à T4 dans le groupe traité au probiotique (NIP), indiquant une probable réduction *via* les GSH de radicaux qui pourrait être due à l'abaissement du niveau d'eau dans les bacs (assimilable à un stress de confinement). Suite à l'infection, les niveaux de GSSG, à T4 et T24 ont augmenté nettement aussi bien chez les animaux traités probiotiques que les animaux contrôles, même si les différences avec les animaux non infectés correspondant n'étaient pas significatives. Les taux de GSSG étaient similaires entre les animaux IC et IP de T4 à T24. L'oxydation du glutathion indique la présence de radicaux, qui sont réduit par l'intermédiaire du glutathion avec ou sans catalyse par les enzymes antioxydantes (GPx et GST) conduisant à la production de glutathion oxydé **(**GSSG). Cette élévation du taux de GSSG indique donc que l'infection à *V. nigripulchritudo* a entraîné la production d'espèces réactives de l'oxygène dans l'hépatopancréas. Castex et al. (2010) avaient déjà observé une évolution similaire chez *L*. *stylirostris* suite à l'infection par *V*. *nigripulchritudo*. Le taux de GSHT étant par ailleurs supérieur chez les animaux traités au probiotique, les voies de détoxification utilisant le glutathion pourraient être favorisées.

Activité des enzymes impliquées dans la réponse antioxydante et expression relative de leur gène

L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) dans l'hépatopancréas ne montrait aucune variation significative quelles que soient les conditions (Figure 2A). L'activité apparaissait relativement stable dans le temps chez les crevettes NIC, alors que chez les crevettes traitées aux probiotiques (NIP) une augmentation de l'activité était mesurée de T0 à T4 suivie d'une diminution à T24. L'activité de la SOD, de T4 à T24, semblait plus stable chez les animaux NIC par rapport aux animaux IC, alors que chez les animaux traités probiotique une chute de l'activité de la SOD est mesurée chez les animaux NIP et une faible augmentation chez les animaux IP de T4 à T24. Les animaux traités avec des probiotiques à T0, soit 4h post administration du probiotique, semblent avoir une activité SOD plus basse que les animaux témoins. Un phénomène similaire a été observé chez *L*. *stylirostris* traitée avec le probiotique *P*. *acidilacti* (Castex et al., 2010) et également chez *Fenneropenaeus chinensis* élevée en présence de concentrations croissantes de bioflocs composés de 3 souches probiotiques (Kim et al., 2015). Ce niveau plus faible pourrait être expliqué par un état de stress moins marqué chez les animaux traités, produisant ainsi moins d'anions superoxyde. On note cependant une augmentation du niveau d'activité de la SOD 24h post infection chez les animaux probiotiques alors que la tendance est à la diminution chez les animaux contrôles infectés. Duan et al. (2015) décrivent dans l'hépatopancréas de *P. monodon* une phase courte d'augmentation dans les 3 premières heures suivie d'une diminution très importante dès 12h (3 fois plus faible que chez les animaux non infectés) de l'activité de la SOD, suite à l'infection par *V.*

parahaemolyticus. Il semble que le traitement avec le probiotique NC201 pourrait avoir un effet dans le cadre d'une infection, puisque la stimulation n'est observée que chez ces animaux même si décalée à T24.

Les niveaux d'expression relative du gène de la *SOD* chez les animaux NIC et NIP variaient selon un même profil de T0 à T24, cependant puisque le niveau d'expression chez les animaux NIP à T0 est plus élevé que chez les animaux NIC, la chute d'expression est plus élevée à T4 (Figure 2B). Cette diminution d'expression est suivie à T24 par une augmentation aussi bien chez les animaux NIC que NIP mais est moindre chez ces derniers. A T4, l'infection a conduit à une augmentation de l'expression de la SOD aussi bien chez les animaux IC qu'IP, comparativement à l'expression mesurée dans NIC et NIP, respectivement. Le niveau d'expression des animaux IP était significativement plus élevé que celui des animaux NIP. A T24, peu de différence d'expression était observée aussi bien entre les animaux NIC et IC que les animaux NIP et IP. Cependant entre T4 et T24 le niveau d'expression de la SOD a diminué pour les animaux IP et le niveau d'expression était alors plus faible chez les animaux IP comparativement aux animaux IC. Les niveaux d'expression initialement hauts de la SOD peuvent être expliqués par un stress initial dû au transfert aussi bien chez les animaux NIC que NIP. Mais chez ces derniers la présence de *Pseudoalteromonas* NC201 dans l'hémolymphe à T0 (Vu par Sorieul et al., in prep - article 3 de ce manuscrit) pourrait être responsable, d'autant qu'à T4 le nombre de bactéries commence à diminuer dans l'hémolymphe. A ce jour, la présence de bactéries NC201 dans un autre compartiment de la crevette n'a pas été validée. A partir de T4 on observe que l'infection stimule l'expression chez les animaux NIC et NIP avec un niveau d'expression légèrement plus élevé chez les animaux IP. Chez *L. vannamei* une exposition à du β-1.3-glucane stimule l'expression de SOD dans l'hépatopancréas 12h post exposition mais celle-ci chute ensuite à un niveau plus bas dès 24h (Wang et al., 2008). Il se pourrait qu'un phénomène similaire ait lieu lors de l'addition de probiotique et de pathogène, tous deux étant des bactéries Gram négatif. L'expression de la SOD dans les hemocytes chez les animaux NIP et IP suit un profil similaire entre T0 et T4, particulièrement une augmentation de l'expression dans les animaux IP à T4 mais une baisse dès T10 qui pourrait non seulement correspondre à la migration des hemocytes dans les lieux d'infection mais aussi à la mort des hemocytes, notamment par lyse suite à la phagocytose. Cependant, il a été montré que dans l'hépatopancréas, les cellules F hepatopancréatiques produisent de la SOD (Wang et al., 2007). Ainsi, la modulation de l'expression de la SOD peut dépendre du nombre de cellules qui la produisent mais aussi de la régulation du gène.

Le niveau d'expression de SOD était initialement plus élevé chez les animaux traités avec le probiotique, alors que l'activité était quant à elle plus faible. Les animaux traités au probiotiques semblent donc avoir une capacité de synthèse stimulée 24h après le transfert, et 4h après l'administration de probiotique. Ce niveau d'expression est divisé par 4 chez les animaux NIP à T4 tandis que l'activité est stimulée (multipliée par 2). Une légère augmentation est observée entre T4 et T24 dans les 2 groupes.

L'infection induit une surexpression à T4, significative uniquement chez les animaux traités NC201 alors que l'activité enzymatique ne varie que très faiblement (légère diminution, non significative). Une stimulation de l'expression est également mesurée chez *L vannamei* suite à l'infection par *V. parahaemolyticus* (Ji et al 2011). Cette réponse est par ailleurs plus précoce (dès 3h post infection) dans l'hépatopancréas comparativement aux branchies (24h post infection).

Le profil de l'**activité enzymatique de la catalase (CAT)** chez les animaux NIC montrait une diminution de l'activité à T4 suivie d'une légère augmentation à T24, alors que chez les

animaux NIP, le niveau d'activité qui est plus faible que chez les animaux NIC à T0, tendait à augmenter à T4 mais chutait drastiquement à T24, cette diminution est cependant non significative (Figure 3A). Les niveaux d'activité de CAT chez les crevettes NIC et IC sont équivalentes à T4, et l'activité apparaissait plus élevée chez les animaux IC à T24. Les niveaux d'activité de CAT des animaux NIP et IP suivent la même dynamique, des activités de même niveau étaient mesurées à T4 alors qu'à T24 une activité légèrement plus élevée apparaissait chez les animaux IP. Le niveau d'activité de CAT chez les animaux IC et IP était similaire à T4 mais à T24 l'activité enzymatique de CAT est très supérieure chez les animaux IC, bien que non significativement différente de celle mesurée chez les animaux IP.
Le niveau initial de l'activité de CAT était plus faible pour les animaux NIP, ce qui pourrait signifier un impact plus faible du stress de transfert sur ces animaux, ou un état de stress globalement plus faible des animaux comme observé chez *L*. *stylirostris* lors d'un traitement par *P*. *acidilacti* (Castex et al., 2010). Par contre, l'augmentation d'activité de la catalase suite à l'abaissement du niveau d'eau chez les animaux NIP indiquerait une production de H_2O_2 consécutive au stress de confinement appliqué. S'en suit une diminution importante de l'activité de la CAT à 24h chez les animaux NIP, probablement associée à un plus faible niveau de H_2O_2 et une récupération du stress initial. L'infection semble légèrement augmenter l'activité de CAT à T24 chez les animaux IC et IP, ce qui pourrait être lié à une augmentation d'H_2O_2 produit en réponse à l'infection. La diminution observée chez *P*. *monodon* 12h post injection de pathogènes (Duan et al., 2015) et attribuée à des dommages cellulaires potentiels chez les animaux infectés, n'est dans le cas présent pas observée. Une légère tendance à l'augmentation est même observée à T24.
Le niveau d'expression relative du gène *Cat* était équivalent pour les animaux NIC et NIP à T0 et restait stable à T4 (Figure 3B). A T24 une hausse était observée pour les deux populations particulièrement accentuée chez les animaux NIC *vs* NIP, bien qu'aucune différence n'était significative. L'infection semblait conduire à l'augmentation de l'expression de *Cat* dès 4h post infection chez les animaux IC, cependant à T24 l'expression relative de *Cat* est inférieure chez les animaux IC comparativement à celle des animaux NIC. Un profil similaire d'expression relative de *Cat* était observé chez les animaux traités probiotique, une moindre augmentation d'expression à T4 et une diminution plus importante à T24 étaient observées chez les animaux IP comparativement aux animaux NIP. Comparé à T4, le niveau de *Cat* chez les animaux IP est plus bas que celui des animaux IC, cette différence est également observée à T24. At T4 la quantification des *Vibrio* dans l'hémolymphe (Sorieul et al., in prep - article 3 de ce manuscrit) a montré que les *Vibrio* représentaient plus de 30% de la THF (flore hétérotrophe totale) alors que dans les animaux IP, les *Vibrio* représentaient moins de 5%. Ainsi l'expression relative plus élevée chez les animaux IC et IP à T4 pourrait être expliqué par cette différence de charge en *Vibrio* dont on ne connait pas encore les autres sites possibles d'infection dans l'animal. Le taux de *Vibrio* dans l'hémolymphe augmente ensuite significativement à T24 chez les animaux IP, après une quasi disparition de NC201. La hausse du niveau d'expression de *Cat* chez les animaux IC à T4 post infection serait corrélée à un niveau plus élevé de H_2O_2 généré par la SOD en réponse à la présence de pathogène comparativement aux animaux IP. Cette stimulation a été observé dans les hépatopancréas de *L*. *vannamei* après injection de molécules reconnues comme non soi (Ji et al., 2009) et suite à l'infection par *V. parahaemolyticus* (Ji et al., 2011). La diminution d'expression de *Cat* observée à T24 pourrait quant à elle être liée à l'augmentation de *Vibrio* et son impact sur la crevette mais peut également être la conséquence d'un niveau cellulaire en H_2O_2 beaucoup plus faible et une détoxification préférentielle *via* les glutathion.

L'activité enzymatique de la glutathion péroxydase (GPX) restait relativement stable de T0 à T24 avec une légère baisse à T4 chez les animaux NIC, alors que chez les animaux NIP pour lesquels le niveau d'activité de la GPX à T0 est significativement plus faible que chez les animaux NIC, une augmentation de l'activité était notée à T4, suivie d'une légère baisse d'activité à T24 (Figure 4A). A T4 post infection, chez les animaux NIC et IC d'une part et les animaux NIP et IP d'autre part, très peu de variation de l'activité de la GPX était mesurée, cependant une tendance à l'augmentation de l'activité était observée chez les animaux IP *vs* NIP. A T24, une tendance à la diminution de l'activité était observée chez les animaux IC vs NIC alors que pour les animaux IP une activité légèrement supérieure aux animaux NIP était mesurée. Aucune différence d'activité de la GPX n'était mesurée à T4 entre les animaux IC et IP alors qu'à T24 les animaux IP présentaient une activité légèrement inférieure à celle des animaux IC. L'activité initiale de la GPX significativement plus faible chez les animaux NIP peut indiquer, à l'instar des tendances observées pour la SOD et la CAT, un niveau de stress plus bas des animaux probiotiques. Les animaux probiotiques, infectés ou non, seraient par ailleurs moins stressés que les animaux témoins tout au long de l'expérimentation. Ces résultats ne sont pas en concordance avec ceux observés chez *Penaeus monodon,* une augmentation de l'expression de la GPX était mesurée 12h après une infection à *Vibrio* (Duan et al., 2015; Liu et al., 2007; K. F. Liu et al., 2010). Il est probable que les challenges effectués par injection aient une réponse plus rapide qu'un challenge par balnéation tel que réalisé dans nos expériences. Un suivi sur une période plus étendue pourrait probablement apporter des éléments de réponse. Un état globalement plus stressé des animaux, dans nos conditions expérimentales, donc un niveau d'activité déjà élevé de la GPX a pu également masquer, une stimulation par la présence du pathogène. Les GPX sont largement distribués dans les cellules et peuvent éliminer H_2O_2 efficacement, même si la concentration de H_2O_2 est très faible, alors que le CAT ne se trouve que dans le peroxysome et ne fonctionne que lorsque la concentration de H_2O_2 est élevée dans les cellules et que le H_2O_2 se diffuse dans le peroxysome (Kang et al., 2005; Zhang et al., 2008). En outre, GPX ont un degré d'affinité plus élevé pour H_2O_2 que CAT (Duan et al., 2016). Par conséquent, la GPX est généralement considérée comme plus efficace que le CAT en tant que système d'élimination de H_2O_2.

Le niveau d'expression relative du gène de la *GPX* des animaux non infectés contrôles (NIC) et traités au probiotique (NIP) a diminué pour atteindre un niveau similaire à T4. Une augmentation a ensuite été observée chez les animaux NIC à T24 alors que le niveau d'expression a peu évolué chez les animaux NIP (Figure 4B). Le niveau d'expression des animaux NIP était significativement plus bas que celui des animaux NIC à T24. Les niveaux d'expression de la *GPX* ont peu varié 4h post infection dans les 2 groupes (NIC vs IC et NIP vs IP), cependant une légère augmentation de l'expression était mesurée aussi bien chez les animaux IC que IP *vs* NIC et NIP, respectivement. A T24, alors que le niveau d'expression était maintenu plus haut chez les animaux IP *vs* NIP, chez les animaux IC le niveau d'expression est inférieur à celui des animaux NIC. Les niveaux d'expression de la *GPX* chez les animaux IC *vs* IP sont légèrement supérieurs aussi bien à T4 qu'à T24.

A l'exception du niveau initial, où l'activité de GPX est significativement plus faible pour les animaux NIP *vs* NIC, l'activité mesurée est équivalente, ainsi l'activité de GPX semble directement corrélée au niveau d'expression relative du gène *GPX*. On observe un niveau d'expression équivalent pour tous les traitements à T4, plus faible que le niveau observé à T0. A T24 apparaît une stimulation de l'expression de *GPX* chez les animaux NIC alors que les NIP semblent stables par rapport à T4. Cette stimulation à T24 similaire à celle de *Cat*, n'est pas expliquée et, comme pour *Cat*, le niveau d'expression est alors plus élevé que chez les autres

traitements. Habituellement l'expression de *GPX* est stimulée par la présence de peroxyde d'hydrogène ou une sous expression de *Cat* (D. Wang et al., 2012). La surexpression de GPX consécutive à l'infection par des *Vibrio* (Liu et al., 2007; Ren et al., 2009a) dans différents tissus (hémocytes, branchies, hépatopancréas) des crevettes est à peine visible dans les premières 24h.

L**'expression relative du gène de la glutathion transférase (GST)** était significativement supérieure (facteur 2.3) à T0 chez les animaux traités avec NC201 comparativement aux témoins (NIC). Le profil d'expression des animaux contrôles (NIC) était ensuite stable entre T0 à T24 avec une légère tendance à l'augmentation, alors qu'une expression élevée mesurée à T0 chez les animaux traités au probiotique (NIP) était suivie par une chute de l'expression à T4, une plus légère baisse était observée à T24 (Figure 5). A 4h post infection peu de variation d'expression était observée chez les animaux NIC *vs* IC et NIP *vs* IP, cependant aussi bien chez les animaux IC qu'IP une légère tendance à l'augmentation de l'expression était observée. Par contre, à T24 aussi bien chez les animaux IC *vs* NIC qu'IP *vs* NIP une tendance à la diminution d'expression était observée. A T4 le niveau d'expression de la *GST* était peu différent chez les animaux IC et IP, alors qu'à T24 le niveau d'expression est plus faible chez les animaux IP.

La GST catalyse la conjugaison du glutathion avec d'autres molécules, permettant ainsi la désactivation de composés toxiques (Nordberg and Arnér, 2001). La surexpression initiale de *GST* liée à la surexpression de *GPX* et à une concentration en GSHT supérieure chez les animaux NIP semble confirmer une utilisation de ce mécanisme de détoxification chez les animaux traités au probiotique. Cette stimulation disparaît à T4 ou tous les traitements sont équivalent, ceci pourrait être dû à la disparition progressive de NC201 dans l'hémolymphe (Sorieul et al., in prep - Article 3 de ce manuscrit). L'administration de *Vibrio* semble avoir un léger effet inhibiteur sur la *GST* à la différence de la surexpression mesurée dans les hémocytes et l'hépatopancréas de la crevette *Exopalaemon carinicauda* suite à l'infection par *V. anguillarum* (Duan et al., 2013). Des mesures à 48 ou 72h post infection sont donc nécessaire pour compléter l'analyse.

Il a déjà été montré que chez la crevette les enzymes de gestion du stress oxydant peuvent être stimulées par injection de peroxyde d'hydrogène (D. Wang et al., 2012). Leurs activités ne sont pas systématiquement liées aux niveaux d'expression de leurs gènes, de plus la CAT et la GPX sont capables de stimuler la synthèse de peroxiredoxine, une autre enzyme antioxydante.

Produits issus de la dégradation cellulaire liée au stress oxydant

La concentration en protéines carbonylées (Carb) à T0 apparaissait plus élevée chez les animaux NIP et diminuait progressivement jusqu'à T24, alors que la quantité de Carb restait stable chez les NIC avec une très légère tendance à l'augmentation à T10 (Figure 6A). La quantité de protéines Carb, quel que soit le temps des prélèvements (T0, T4 et T24), restait supérieure chez les animaux NIP *vs* NIC. L'infection ne semblait impacter la quantité de protéines Carb qu'à partir de T24 puisque aussi bien chez les animaux IC *vs* NIC que lP *vs* NIP, les quantités de Carb à T4 étaient plus faibles, avec une différence plus marquée pour les animaux IP *vs* NIP. A T24, les quantités de protéines Carb étaient plus élevées chez les animaux infectés (IC et IP) avec une différence plus élevée chez les animaux IC *vs* NIC. Les variations des quantités de protéines Carb, aussi bien à T4 qu'à T24 chez les animaux IC *vs* IP étaient faibles, cependant à T4, la quantité de protéines Carb était plus basse chez les animaux IP alors qu'à T24 celle-ci est plus haute.

Les Carb sont issues de la dégradation oxydative des protéines et témoignent ainsi d'une défaillance des mécanismes de protection contre le stress oxydant. On observe à T0 une concentration en Carb supérieure chez les animaux NIP vis-à-vis des NIC, elle pourrait être liée au niveau plus faible de l'activité des enzymes de réponse au stress oxydant (SOD, CAT, GPX). La concentration en Carb semble corrélée à la présence de bactéries dans l'hémolymphe, probiotique ou pathogène. Il est cependant important de noter qu'aucune de ces variations n'est significative et reflète une variabilité déjà observée lors de l'administration de probiotique chez *L*. *stylirostris* (Castex et al., 2010).

La concentration en Malondialdéhyde (MDA) mesurée chez les animaux NIC montrait une diminution au cours du temps (T0, T4 et T24), alors que chez les animaux NIP, un maintien de la quantité en MDA était observé de T0 à T4, suivie d'une diminution significative à T24 (Figure 6B). Les niveaux de MDA des animaux NIC et IC sont quasi identiques à T4 et T24. Par contre chez les animaux IP *vs* NIP, une forte baisse de la quantité de MDA était observée dès 4h post infection, mais non significative. Cependant à T24, le niveau de MDA chez les animaux IP *vs* NIP montrait une tendance à l'augmentation. Les variations des quantités de MDA, aussi bien à T4 qu'à T24 chez les animaux IC *vs* IP étaient faibles, cependant à T4, la quantité de MDA était plus basse chez les animaux IP alors qu'à T24 celle-ci est plus haute.

Le MDA est un peroxyde lipidique qui est, chez les animaux dont les crevettes, utilisé comme indicateur de dommages oxydatifs de la membrane cellulaire (Song et al., 2015). Au cours des 24h de suivi la quantité de MDA baisse après T0 puis reste globalement stable, excepté pour les animaux NIP qui eux restent au même niveau à T4 avant de baisser à T24. L'infection ne semble pas avoir affecté la quantité de MDA chez les animaux témoins dans cette expérimentation. L'augmentation du taux de MDA dans l'hépatopancréas des crevettes bleues 24h post-infection à *V nigripulchritudo* précédemment observé par Castex et al. (2010) n'a pas été observée. Le taux de MDA initialement élevé peut être expliqué par les stress de transfert initial. Le maintien de ce taux élevé chez les NIP peut être une conséquence de la présence de NC201 dans l'animal, et de sa capacité à produire du peroxyde d'hydrogène (Sorieul in prep. - article 2 de ce manuscrit). Comme vu pour la concentration en protéines carbonylées, la baisse de MDA à T24 chez les NIP coïncide avec la disparition de NC201 de l'hémolymphe, même si la disparition complète du probiotique de l'animal reste à démontrer. Une analyse de ces bioindicateurs à 48 et 72h post infection, au moment de l'apparition des premières mortalités aurait probablement permis d'observer l'impact du *Vibrio* pathogène *via* une hausse de MDA et Carb chez les animaux infectés.

Les niveaux initiaux (T0) plus élevés de glutathion total et d'expression de la *SOD GPX*, *GST* et la stimulation transitoire de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPX et CAT chez les animaux NIP indiquent une gestion efficace des ROS formés suite au stress de confinement et peut-être par NC201. Le système antioxydant permet de diminuer le niveau d'oxydation des lipides et des protéines. L'infection à *V. nigripulchritudo* entraîne probablement la production de ROS qui n'induisent cependant pas d'oxydation significative des lipides dans les premières 24h. La stimulation de la synthèse de GSH, la production croissante de GSSG ainsi que la surexpression de la superoxyde dismutase (T4) et de la catalase (T24) chez les animaux contrôles et traités au probiotique témoignent de la présence de ces radicaux. Les animaux traités avec le probiotique NC201 présentent suite à l'infection une meilleure capacité de biosynthèse des glutathion et tendent à plus stimuler l'expression (T4) et l'activité (T24) de la SOD par rapport au groupe contrôle. L'effet modéré de l'infection sur les bioindicateurs des défenses antioxydantes mesurés dans l'hépatopancréas des animaux traités avec NC201 est à mettre en relation avec l'invasion retardée du *Vibrio* pathogène, du fait de la présence de

NC201 dans l'animal. L'impact de l'infection était moindre sur les animaux traités (survie améliorée), les capacités de défenses de l'animal ont donc été plus efficaces que chez les animaux contrôles. Une évaluation sur 3 jours (compte tenu de l'apparition des premières mortalités à T45) et étendue au tissu branchial (voie d'entrée privilégiée lors des infections par balnéation) aurait sûrement permis de mieux distinguer la relation entre l'amélioration de la survie des animaux traités au probiotique NC201 et leur gestion du stress oxydant lors des challenges infectieux.

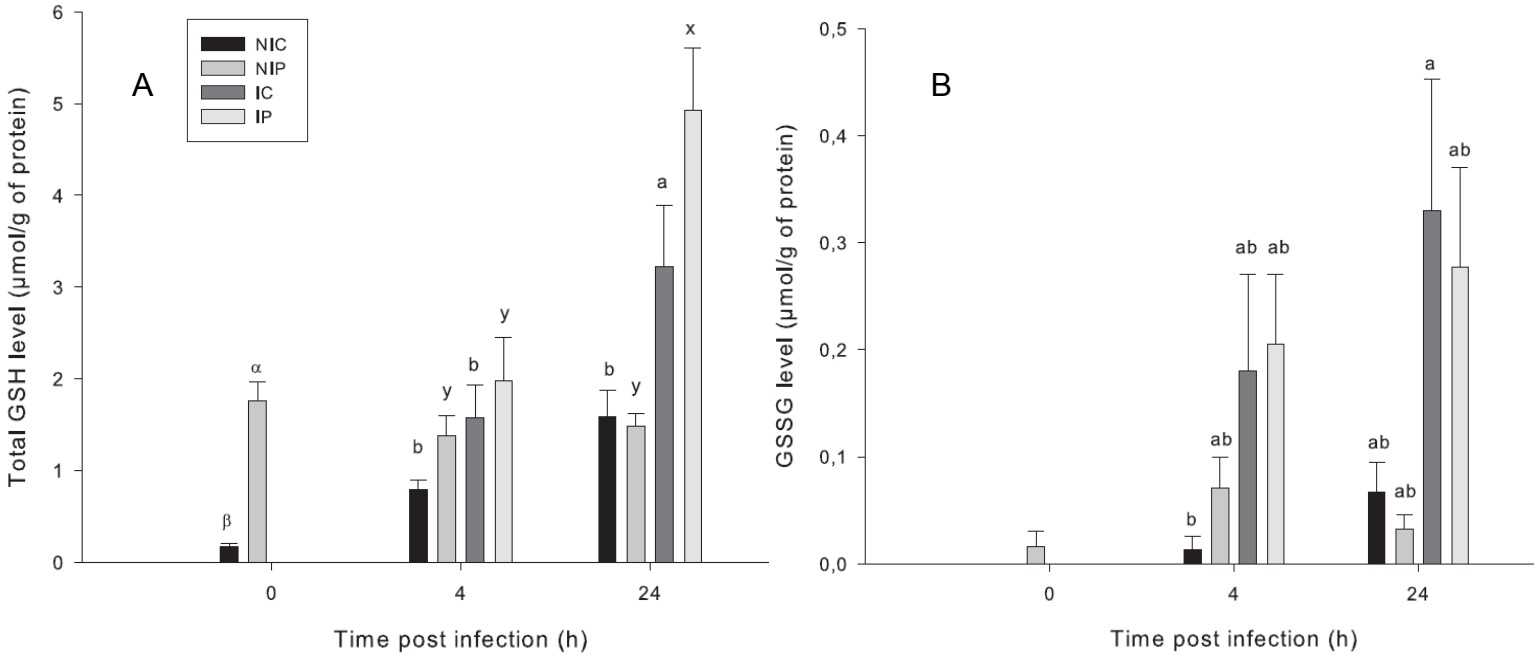


Figure 1: Concentration en glutathion totale (A) et de la glutathion peroxydée (B) dans l'hépatopancréas de *L. stylirostris*. Animaux témoins non infectés (NIC), animaux probiotiques non infectés (NIP), animaux témoins infectés (IC) et probiotiques infectés (IP). Les groupes de lettres indiquent un traitement statistique séparé (α, β), (a,b,c) et (x,y). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

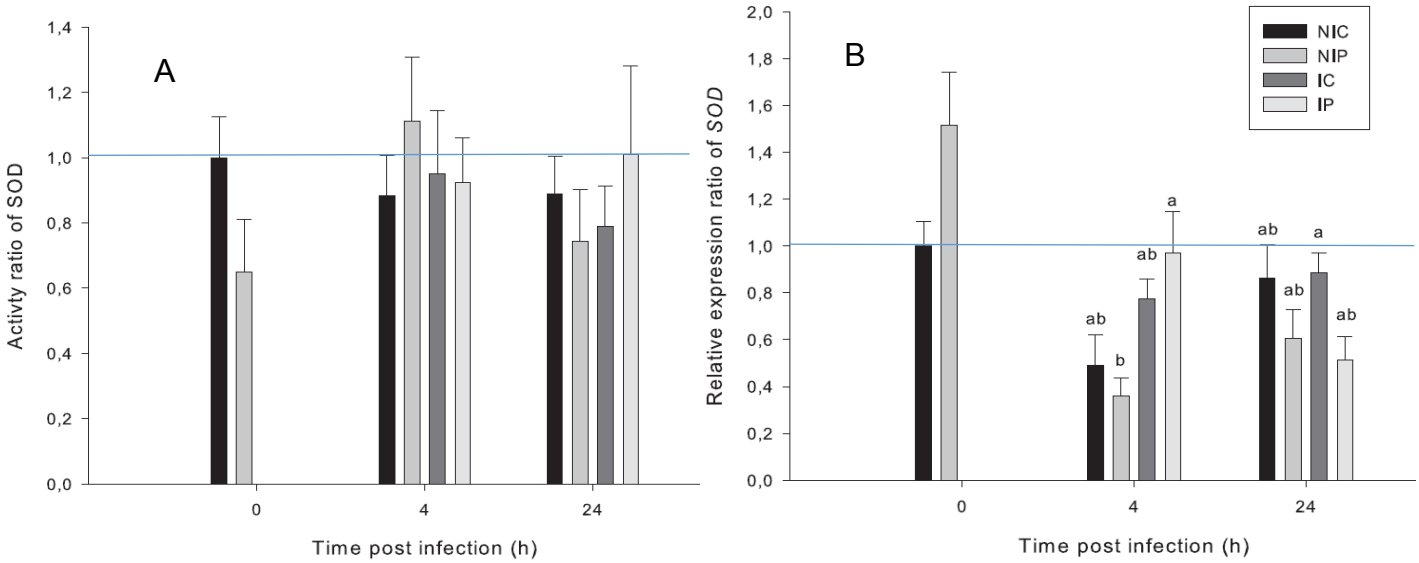


Figure 2: Ratio de l'activité (A) et de l'expression relative (B) de la superoxyde dismutase (SOD) rapportées au niveau initial des NIC. Animaux témoins non infectés (NIC), animaux probiotiques non infectés (NIP), animaux témoins infectés (IC) et probiotiques infectés (IP). La ligne bleue indique le niveau de référence (NIC, T0). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

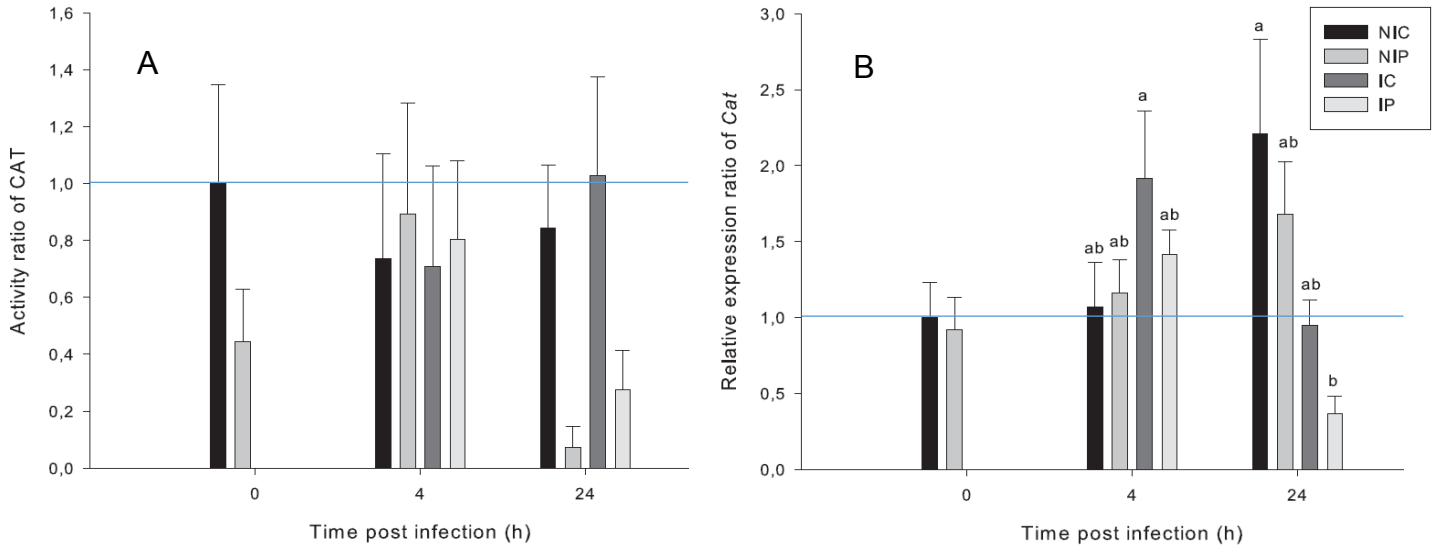


Figure 3: Activité (A) et expression relative (B) de la catalase (CAT) rapportées au niveau initial des NIC. Animaux témoins non infectés (NIC), animaux probiotiques non infectés (NIP), animaux témoins infectés (IC) et probiotiques infectés (IP). La ligne bleue indique le niveau de référence (NIC, T0). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

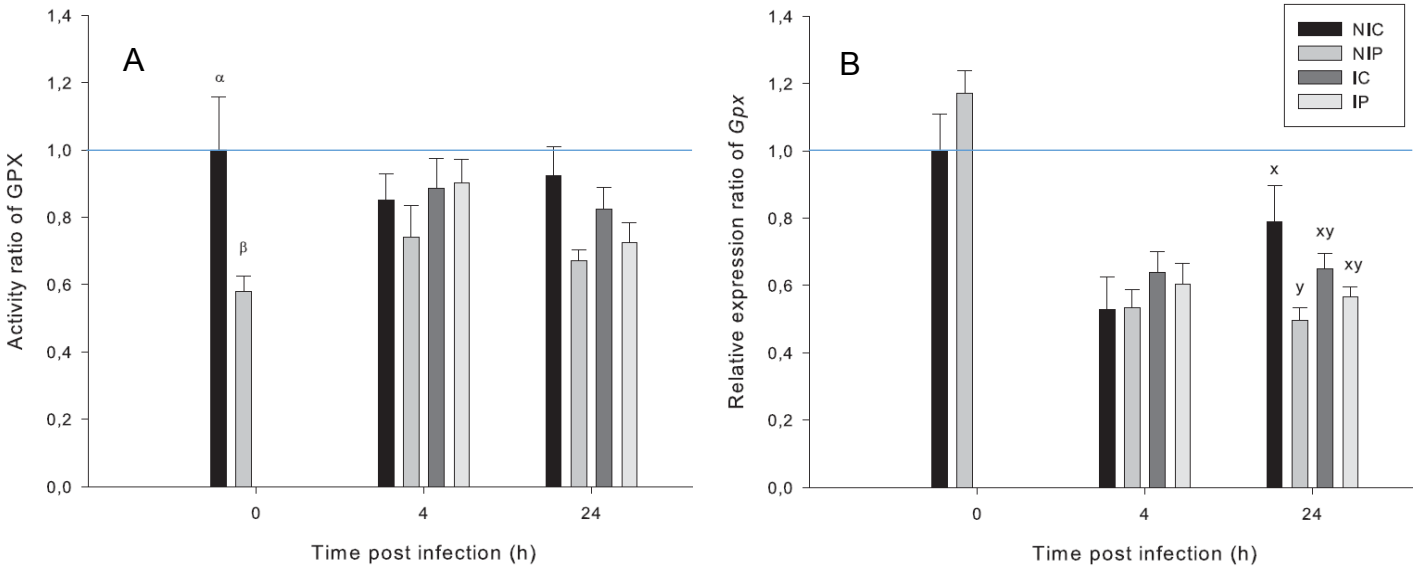


Figure 4: Activité (A) et expression relative (B) de la glutathion peroxydase (GPX) rapportées au niveau initial des NIC. Animaux témoins non infectés (NIC), animaux probiotiques non infectés (NIP), animaux témoins infectés (IC) et probiotiques infectés (IP). La ligne bleue indique le niveau de référence (NIC, T0). Les groupes de lettres indiquent un traitement statistique séparé (α, β) et (x,y). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

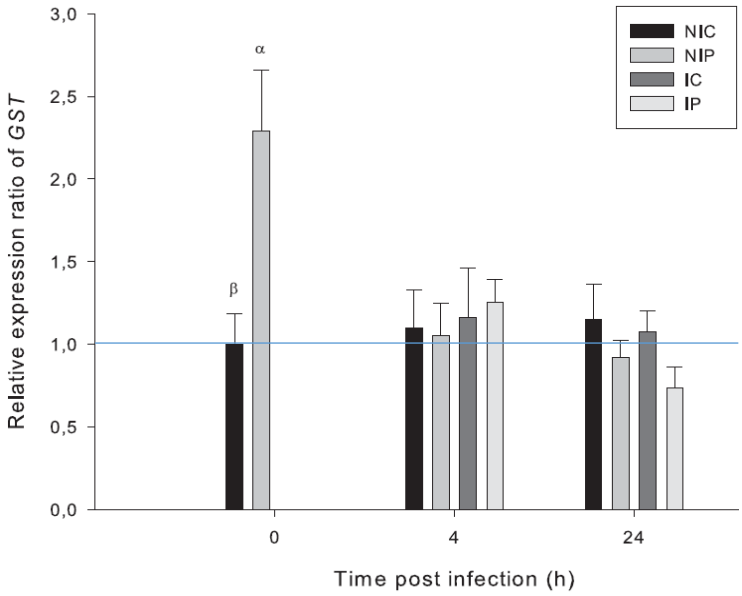


Figure 5: Expression relative de la glutathion transférase (*GST*) rapportée au niveau initial des NIC. Animaux témoins non infectés (NIC), animaux probiotiques non infectés (NIP), animaux témoins infectés (IC) et probiotiques infectés (IP). La ligne bleue indique le niveau de référence (NIC, T0). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

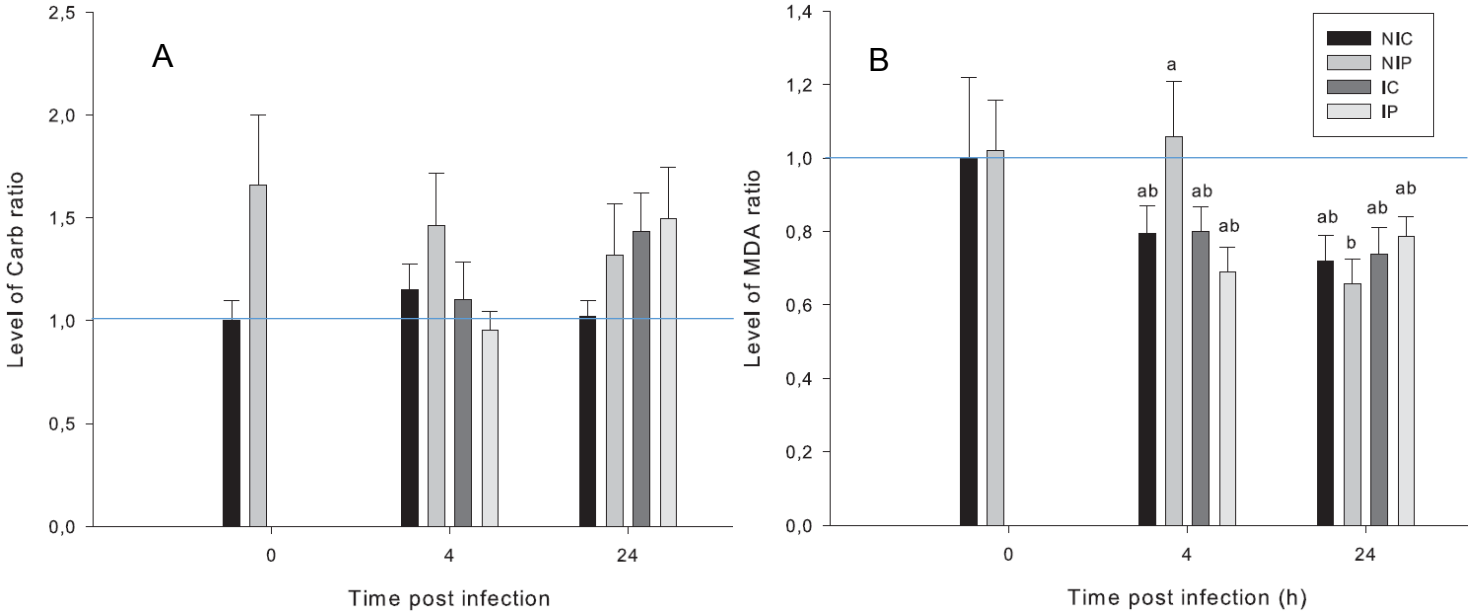


Figure 6: Quantité de protéines carbonylées (Carb) (A) et de malondialdéhyde (MDA) (B) rapportées au niveau initial des NIC. Animaux témoins non infectés (NIC), animaux probiotiques non infectés (NIP), animaux témoins infectés (IC) et probiotiques infectés (IP). La ligne bleue indique le niveau de référence (NIC, T0). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

Tableau 1: Liste des amorces utilisées en qPCR pour quantifier l'expression des gènes impliqués dans la réponse à un stress oxydant.

Non	Gène	Amorce forward (5' - 3')	Amorce reverse (5' - 3')	Reference
SOD	Superoxidismutase	ATCCACCACACAAAGCATCA	AGGACTGGAATGATCCAAAGC	Saulnier et al. 2014
Cat	Catalase	TACTGCAAGTTCCATTACAAGACG	GTAATTCTTTGGATTGCGGTCA	
GPX	glutathion peroxidase	TCAACAGCTGATCCCGTCT	CCTTGCCGATGAGGAATTT	Cardona
GST	glutathion transférase	CTGGAGAAGCTGCACGAAG	GTCACGTTCCTGTGCTTGC	Cardona
EF-α	Facteur d'élongation	TGCTCACATTGCCTGCAAGT	CCTTACCAGTACGCCTGTCGAT	

Tableau 2: Niveaux des effecteurs de la balance pro/antioxydant et des marqueurs du stress oxydant à T0 pour les animaux témoins (NIC) et traités avec NC201 (NIP): concentration de la glutathion totale et de la glutathion peroxydée, activité et expression des enzymes superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPX), expression de la glutathion transférase (GST), taux de protéines carbonylées et malondialdéhyde. Les différences significatives sont marquées d'un astérisque (*) ($p < 0,05$)

	NIC	NIP	NIP/NIC
total [GSH] (µmol/g prot)	0,17 ± 0,20	1,76 ± 0,20 *	10,65
[GSSG] (µmol/g prot)	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01	
CAT activity (U/mg prot)	2,09 ± 0,73	0,93 ± 0,37	0,44
CAT expression	1,07 ± 0,25	0,98 ± 0,24	0,92
GPX activity (U/mg prot)	31,03 ± 4,86	17,96 ± 1,41 *	0,58
GPX expression	1,59 ± 0,17	1,86 ± 0,11	1,17
SOD activity (U/mg prot)	3,19 ± 0,40	2,07 ± 0,51	0,65
SOD expression	1,59 ± 0,17	2,40 ± 0,36	1,51
GST expression	0,97 ± 0,18	2,22 ± 0,36 *	2,29
Carbonyl (nmol/mg)	21,51 ± 2,09	35,65 ± 7,36	1,66
MDA (nmol/mg)	1,79 ± 0,39	1,83 ± 0,25	1,02

Chapitre III : Conclusion générale et Perspectives

Conclusion générale et Perspectives

Cette thèse avait pour objectif d'étudier la souche NC201, *Pseudoalteromonas* isolé en Nouvelle-Calédonie, qui constitue un probiotique potentiel pour les élevages de crevettes. L'utilisation de probiotique dans les élevages apparaissant comme une alternative intéressante aux antibiotiques, particulièrement en élevage larvaire, et pouvant contribuer à améliorer l'état physiologique des crevettes (Pham et al., 2014).
Dans ce contexte, mes travaux de recherche ont été focalisés dans une première partie sur la bactérie elle-même et dans une seconde partie sur l'impact de cette bactérie sur la santé de l'animal. L'étude du génome de NC201 et ses molécules antimicrobiennes sécrétées ont montré la capacité antimicrobienne de la souche NC201 et son mode d'action antimicrobien potentiel. L'impact de la souche NC201 sur l'évolution du microbiote du milieu d'élevage a été abordé. La seconde partie a consisté à étudier les paramètres/biomarqueurs physiologiques de la crevette *L. stylirostris*, notamment de la réponse immunitaire et de la réponse au stress oxydant, engendrées par la présence du probiotique dans le milieu d'élevage.

La souche, *Pseudoalteromonas*, NC201 : caractérisation et potentiel antimicrobien
L'étude du génome a montré, par hybridation d'ADN *in silico*, que la souche NC201 est très proche de la souche *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1 (Yu et al., 2012a) qui est-elle même plus proche de l'espèce *P. piscicida* (ATCC 15057) que de la souche de référence *P. flavipulchra* NCIMB2033. Les souches du genre *Pseudoalteromonas* sont connues pour avoir des séquences ribosomiques 16S très proches (98-99.9%) (Ivanova et al., 2004) ce qui fragilise l'utilisation de ces séquences pour l'attribution des souches à une espèce et de leur phylogénie. L'analyse des génomes de ces souches du genre *Pseudoalteromonas* pourrait donc avoir révélé une erreur d'identification de la souche JG1 (Jin et al., 2010). Les souches NC201 et JG1 pourraient alors être classées dans l'espèce *P. piscicida*.
Le genre *Pseudoalteromonas* est connu pour sa capacité à produire des composés antimicrobiens (Offret et al., 2016). Un sous-genre de *Pseudoalteromonas* est identifié de par la pigmentation jaune-orange des colonies bactériennes et le fort potentiel antimicrobien des espèces le constituant (Bosi et al., 2017). L'analyse du génome de NC201, colonies pigmentées en jaune-orange, a permis de mettre en évidence 8 clusters codant potentiellement pour des métabolites secondaires antimicrobiens. Cette analyse coïncide avec les observations faites sur l'ensemble de *Pseudoalteromonas* pigmentés qui présentent entre 6 et 18 de ces clusters (Bosi et al., 2017). En plus de ces métabolites secondaires, des gènes codants des amino acides oxydases ont été mis en évidence dans la séquence génomique de la souche NC201. Chez *P. flavipulchra* JG1, ces enzymes par la production de peroxyde d'hydrogène, sont capables d'inhiber des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques comme des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (Chen et al., 2010). Nos résultats ont mis en évidence la présence de deux séquences codant pour des enzymes de ce type chez NC201, la lysine oxydase like (LodA-like) dans le chromosome et une séquence proche de la PfaP dans le chromid. Ces deux séquences ont été retrouvées chez *P. flavipulchra* JG1, dans laquelle seule la PfaP semble active (Yu et al., 2012b).
Cette analyse du génome a été complétée par une étude de la capacité antibactérienne du surnageant de culture de la souche NC201. Ainsi, la protéine correspondant à la séquence de la LodA-like, de par la masse moléculaire de la protéine attendue, s'est avérée capable d'inhiber une souche de *V. alginolyticus* résistante à l'oxytétracycline. Le surnageant de culture de NC201 avait préalablement montré des propriétés d'inhibition vis-à-vis de plusieurs

Vibrios pathogènes potentiels d'espèces aquatiques : *V*. *harveyi*, *V*. *penaeicida*, *V*. *nigripulchritudo*, *V*. *alginolyticus*. Pour comparaison, la souche *P. flavipulchra* JG1, également considérée pour une utilisation probiotique, est inhibitrice de *V*. *harveyi* et *V*. *alginolyticus* ainsi que de bactéries non testées chez NC201 : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Aeromonas hydrophila* (Jin et al., 2010).
La sélection de souches bactériennes sur leurs capacités antibactériennes pour des essais d'application probiotique est une pratique courante (Hjelm et al., 2004). Cette approche a été utilisée pour la sélection de la souche NC201 et a conduit aux premiers essais de son utilisation comme probiotique en élevages larvaires de *L*. *stylirostris* (Pham et al., 2014). Ces auteurs ont démontré l'apport bénéfique de la souche NC201 notamment au niveau des survies et de l'indice de développement des larves. Ainsi suite à ces travaux, nos recherches ont été orientées sur l'effet de NC201 sur la santé de la crevette, *L. stylirostris,* pour aborder la compréhension de l'effet probiotique dû à la souche NC201.

Confirmation de l'effet probiotique : Amélioration de l'état de santé général de la crevette

A ce jour, aucun *Pseudoalteromonas* n'a été testé comme probiotique chez les crevettes pénéides, en dehors des essais avec la souche NC201 dans les élevages larvaires (Pham et al., 2014). Cependant, le *Pseudoalteromonas undina* a été testé en élevage larvaire chez le crabe (Nogami and Maeda, 1992) et un *Pseudoalteromonas sp*. sur les larves de langouste (Goulden et al., 2012). Les autres souches de *Pseudoalteromonas*, telles que *Pseudoalteromonas sp.* X153 (Longeon et al., 2005) ou *P*. *flavipulchra* JG1 (Jin et al., 2010), considérées pour une application en élevages aquacoles n'ont pas encore donné lieu à des résultats *in vivo* publiés, hormis des tests de toxicité pour les larves de mollusque de la souche X153 (Longeon et al., 2005).
Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, ont confirmé l'innocuité de NC201 pour les juvéniles et subadultes de *L*. *stylirostris*. En effet les oxydases identifiées chez les *Pseudoalteromonas* peuvent être cytotoxiques et auraient pu avoir un effet délétère pour les crevettes (Stiles et al., 1991). Les résultats chez les animaux subadultes confirment également l'effet probiotique de NC201, observés chez les larves de *L*. *stylirostris* (Pham et al., 2014). En effet, l'administration de NC201 a conduit à une amélioration des survies des animaux aussi bien après un stress biotique, infection par un pathogène, qu'un stress abiotique, stress salin.

Evaluation de l'effet probiotique par stress abiotique
L'effet du probiotique NC201 sur l'état physiologique des animaux a été évalué par l'application de stress abiotique consistant en un transfert à des salinités extrêmes. Ainsi, lors de stress hyposalins et hypersalins sur des animaux juvéniles traités au probiotique NC201, les mortalités ont été divisées par 2, passant de 24 à 12% et de 15 à 6%, respectivement ; lors d'un stress hyposalin chez les animaux subadultes traités au probiotique, les mortalités ont été diminuées de 58 à 39%. Chez ces animaux de plus grande taille, l'évolution de la pression osmotique (PO) de l'hémolymphe a permis de montrer que cette meilleure résistance des animaux traités aux probiotiques est probablement liée à une plus grande capacité de régulation ionique. En effet, lors du stress hyposalin (5ppt) les animaux traités régulent plus rapidement leur PO qui est significativement plus élevée 24h post stress comparativement aux contrôles. Un suivi de la PO deux jours supplémentaires aurait été utile pour déterminer si l'amélioration de la survie des animaux traités se traduit dans le temps par une différence de niveau d'équilibre de la PO entre les animaux traités probiotique et les contrôles. La

pression osmotique est un indicateur de l'état de stress chez les crustacés, car illustre la capacité de l'animal aquatique à réguler la composition ionique de son milieu intérieur (Lignot et al., 2000; Wabete et al., 2008). Chez les postlarves de *L*. *vannamei* une augmentation de la résistance au stress osmotique a été observée après ajout d'une souche de *B. licheniformis* (Franco et al., 2016). Cet effet n'est cependant pas systématique lors de l'ajout de probiotiques, ainsi l'administration d'un probiotique *Bacillus sp.* à *Homarus gammarus* n'a pas significativement affecté ses capacités osmorégulatrices (Middlemiss et al., 2015).

Evaluation de l'effet probiotique par challenge infectieux

Les infections avec un pathogène de *L*. *stylirostris*, *V*. *nigripulchritudo*, ont révélé que l'élevage en présence de NC201 permettait une diminution de la mortalité de 48 à 23% chez les animaux traités. Cette augmentation des survies témoigne d'une protection des animaux vis-à-vis du pathogène par le traitement probiotique. Cette amélioration est similaire à celle déjà observée chez *L*. *vannamei* infecté avec *V*. *alginolyticus* dans le cadre d'un traitement probiotique avec *Lactobacillus plantarum* (Chiu et al., 2007; Ramírez et al., 2017). Chez *L*. *vannamei* également, un traitement avec *Aeromonas bivalvum* a conduit à des survies améliorées lors d'une infection avec *V*. *harveyi* (Hao et al., 2014). Une amélioration des survies de *M*. *japonicus* par *Bacillus licheniformis* et *B*. *subtilis* lors d'une infection par *V*. *alginolyticus* a également été observée (Zhang et al., 2011). Cet effet protecteur de la souche NC201 *in vivo* pourrait potentiellement être dû à la capacité inhibitrice de la souche NC201 observée *in vitro* qui montrait l'effet antibactérien des surnageants de NC201 vis-à-vis de *V. nigripulchritudo* ainsi que de l'inhibition de croissance de ce *Vibrio* par la bactérie NC201.

Il est intéressant de noter que NC201 est capable de coloniser l'animal puisque cette souche est retrouvée dès 2h post administration dans l'hémolymphe des animaux. Elle a montré pouvoir représenter jusqu'à 30% de la flore hétérotrophe totale mais apparemment n'est pas capable de se maintenir dans ce compartiment puisque moins de 48h après son administration elle n'est quasiment plus détectée dans l'hémolymphe (Sorieul et al., in prep – Article 3 de ce manuscrit). Son devenir dans d'autres tissus de l'animal n'a pas encore été étudié. Les premiers essais de suivi dans la flore intestinale ne permettent pas de conclure à ce jour. La souche NC201 ne se maintient pas non plus dans l'eau d'élevage et à priori ne forme pas de biofilm sur les parois des bacs (comm. pers. D. Pham). Des recherches sont nécessaires pour compléter ces premiers essais et analyser les modifications potentielles du microbiote de la crevette et du milieu d'élevage suite au traitement probiotique par NC201.

Réponse aux stress de *L. stylirostris* après traitement au probiotique, NC201

Influence sur la réponse immunitaire des hémocytes

Le traitement au probiotique NC201 permet une amélioration des taux de survies de *L. stylirostris* suite à un challenge bactérien par *V. nigripulchritudo*. Ces taux de survie améliorés pourraient s'expliquer par la pré-stimulation du système immunitaire par le probiotique, protégeant l'organisme en induisant une réponse immunitaire plus importante au moment de l'infection par un pathogène. Dans ce contexte, des animaux traités probiotiques (depuis 6 mois) ont été infectés par *V. nigripulchritudo* et l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire a été quantifiée. La réponse immunitaire chez les pénéides est classiquement évaluée par l'analyse du nombre total d'hémocytes circulants, de la synthèse de peptides antimicrobiens, des effecteurs de la cascade ProPO, et des mécanismes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Bachère et al., 1995; Rodriguez and Le

Moullac, 2000; Tassanakajon et al., 2013). Dans le cadre des travaux de cette thèse, la réponse immunitaire a été évaluée selon le nombre d'hémocytes circulants totaux (THC, total hemocytes count), l'expression des gènes impliqués dans l'immunité *LGBP*, *SerProt*, *ProPO1*, *Tgase*, *SOD*, *stylicine*, *ALF*, *Pen3* et *Lys*.

Le THC n'était pas affectée significativement par le traitement probiotique NC201 ni par l'infection par *V. nigripulchritudo*. L'abaissement de la THC est généralement observé lorsque l'infection est réalisée par injection qui engendre une migration d'hémocytes dans ce site dans les heures qui suivent l'injection (Bachère, 2000; Muñoz et al., 2004). Dans la littérature peu de challenge, et plus particulièrement après traitement probiotique, sont réalisés par immersion des animaux dans de l'eau contenant les bactéries. Néanmoins dans nos travaux, en l'absence de piqûre, les bactéries c'est à dire le probiotique NC201 et le *V. nigripulchritudo,* sont observées dès 4-6h post infection dans l'hémolymphe à des taux de 15-30% de la flore hétérotrophe totale. L'invasion de l'hémolymphe chez les animaux témoins infectés par *Vibrio* indique qu'il pourrait s'agir du site d'infection principal qui pourrait conduire à une prolifération des hémocytes néanmoins non observée dans notre étude. Chez les animaux probiotiques infectés la faible présence de *Vibrio* suggère que les *Vibrio* pourraient coloniser un autre site qui reste à mettre en évidence. Des sites tels les branchies et l'organe hématopoïétique, sites d'infection pour *V. vulnificus* et *V. penaeicida* (Alday-Sanz et al., 2002; Muñoz et al., 2004; Takahashi et al., 1985) pourraient aussi être des sites d'infection pour *V. nigripulchritudo.* L'abaissement du nombre d'hémocytes circulants dans l'hémolymphe est suivi rapidement d'une augmentation résultant de la stimulation du processus d'hématopoïèse (Muñoz et al., 2002). Dans notre étude, l'absence de modulation du nombre d'hemocytes peut être due à l'utilisation d'animaux à différents stades de mue qui a été démontré affecter le nombre d'hémocytes (Le Moullac et al., 1997).

Le LGBP, responsable de la reconnaissance de pathogènes Gram négatif et de champignons (Wang and Wang, 2013), n'est pas affecté par la présence de NC201. Il est cependant surexprimé chez les animaux probiotiques infectés 24h post infection. Ainsi, le *LGBP* semble avoir une expression plus faible en présence de NC201 mais surexprimée en présence de *V. nigripulchritudo*. Le probiotique semble donc contribuer à l'amélioration de la réponse de l'hôte lors de l'infection par le pathogène, *V. nigripulchritudo*. Il a déjà été mis en évidence que le LPS de bactéries lysées, comme *V. harveyi*, *V. alginolyticus* et *S. aureus*, pouvait stimuler l'expression de *LGBP* (Amparyup et al., 2012; Liu et al., 2009). L'injection de bactéries vivantes peut également stimuler l'expression de *LGBP*, comme observé chez *L. vannamei* après injection de *V. alginolyticus* (Cheng et al., 2005b). Chez les animaux témoins le niveau d'expression de *LGBP* initial semble élevé et pas ou peu affecté par la présence de *V. nigripulchritudo*, ce qui soulève la question d'un potentiel mécanisme d'échappement à la détection de ce pathogène.

La sérine protéase (SerProt) et la prophénoloxydase (ProPO1) sont impliquées dans le processus de mélanisation. Le niveau d'expression de leur ARNm semble d'abord inhibé par la présence de bactéries, que ce soit le *Vibrio* pathogène ou le probiotique NC201 dans l'hémolymphe. Chez les animaux non infectés, on remarque que l'expression de *ProPO1* est fortement diminuée à 24h post infection par le traitement probiotique NC201 alors que l'infection ne semble pas avoir d'impact sur les animaux témoins et probiotiques. Un *Lactobacillus plantarum* probiotique a déjà montré sa capacité à stimuler le niveau d'expression de *ProPO* chez *L. vannamei* (Chiu et al., 2007). Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse rejoignent la controverse mis en avant chez les arthropodes en général que la mélanisation n'est pas synonyme de réponse efficace ou adaptée face à un pathogène

(Cerenius et al., 2008). En contraste un *Bacillus subtilis* chez *L*. *vannamei* a conduit à augmentation de l'activité de la phénoloxydase (Tseng et al., 2009) due à une surexpression de *ProPO1* et de *ProPO2* (K.-F. Liu et al., 2010). Les séquences de *ProPO1* et *ProPO2* sont apparentées mais possèdent chacune leur voie d'expression propre et peuvent donc être inhibées sélectivement (Amparyup et al., 2009). Il est particulièrement intéressant de noter que les deux formes de ProPO sont nécessaires pour assurer l'activité de la phénoloxydase, ainsi une inhibition de l'une ou l'autre a provoqué des mortalités égales aux mortalités observées lors de l'inhibition des deux ProPO chez *P*. *monodon* infectée avec *V*. *harveyi*. Ce résultat suggère une forme active hétéromérique de la phénoloxydase (Amparyup et al., 2009).

La transglutaminase (Tgase) impliquée dans le processus de coagulation est surexprimée chez les animaux témoins infectés 10 h post infection. Les animaux traités au probiotique semblent avoir au même moment un niveau d'expression équivalent aux animaux non infectés mais cette expression commence à croître à partir de 24h post infection. L'expression de la *Tgase* semble ainsi corrélée à la présence de pathogène dans l'hémolymphe, NC201 ne déclenchant pas l'expression de la *Tgase*. Ces résultats coïncident avec ceux observés chez *L*. *vannamei* lors d'infection avec *V*. *harveyi* (Han-Ching Wang et al., 2010) et *V*. *alginolyticus* (Yeh et al., 2013). Il est intéressant de noter que certains stress abiotiques comme une exposition aux nitrites, peuvent également stimuler l'expression de la *Tgase* (Guo et al., 2016). Il a été montré chez *M*. *japonicus*, que la Tgase joue un rôle dans la régulation de la synthèse de peptides antimicrobiens (AMP) en plus de leur activité coagulatrice (Fagutao et al., 2012). Ainsi, l'expression des AMPs ne devrait pas être stimulée *via* cette voie chez les animaux traités avec NC201.

La superoxyde dismutase (SOD) est impliquée dans la détoxification des anions superoxydes libérés lors de la réponse immunitaire (Wang et al., 2008). Cette libération provoque un « burst » oxydatif généré par les hémocytes. Les animaux contrôles infectés ont un niveau d'expression peu modulé au cours de l'infection alors que ceux traités avec NC201 montrent un pic d'expression à 4h et à 24h post infection, indiquant la présence d'ions superoxyde. Ces résultats suggèrent une réaction plus rapide du système immunitaire des animaux probiotiques avec un « burst » oxydatif et une stimulation de l'activité de la SOD. Une autre explication serait qu'à l'entrée de *V. nigripulchritudo* dans l'hémolymphe, le probiotique NC201, déjà présent lui-même dans l'hémolymphe, va libérer des molécules telles que des amino acides oxydases contribuant à la libération de peroxyde d'hydrogène pour agir contre le *Vibrio* pathogène. Le déclenchement de ces mécanismes chez le probiotique NC201 entraînerait la mort/lyse des bactéries NC201 qui libèrent des ROS qui pourraient être à l'origine du déclenchement de l'expression de la SOD. La lyse potentielle de *V*. *nigripulchritudo* *via* les molécules toxiques sécrétées par le probiotique NC201, pourrait aussi être responsable d'une détection de débris bactériens reconnus par le système immunitaire et donc de production de ROS. Dans les biofilms il a été montré que *Pseudoalteromonas tunicata* était capable de contrôler sa propre population lors de la formation de biofilms *via* l'action autotoxique d'une amino acide oxydase qu'elle produit (Mai-Prochnow et al., 2008, 2004). Cette activité autotoxique est due à la synthèse de peroxyde d'hydrogène et confère à *P*. *tunicata* une activité antimicrobienne assurant la formation de biofilm monospécifique (Franks et al., 2006; Rao et al., 2005). Le deuxième pic d'expression de la SOD pourrait correspondre à une augmentation du nombre du *Vibrio* pathogène dans l'hémolymphe concomitante à la diminution du nombre de probiotique NC201. La chute d'expression de SOD à T10 pourrait correspondre à la baisse du nombre d'hémocytes dû à la lyse des hémocytes

après phagocytose ainsi qu'à la migration des hémocytes dans d'autres sites d'infection comme montré par Munoz et al (2002 et 2004). La faible modulation de l'expression de la SOD entre T4 et T24, et la sous expression de la SOD chez les animaux IC *vs* NIC à T4 et T10, suggèrent que le *V. nigripulchritudo* échappe aux mécanismes de déclenchement de la réponse immunitaire et même pourrait l'inhiber puisque une expression de la SOD est supérieure dans les contrôles non infectés. Cette baisse de SOD a déjà été observée lors de challenge infectieux chez *L*. *vannamei* après un challenge infectieux à *V*. *alginolyticus* (Li et al., 2008) et WSSV (Rameshthangam and Ramasamy, 2006), entre 12 et 24h post infection. Cette baisse peut suivre un pic initial d'expression de la SOD comme observé chez *P*. *monodon* (Duan et al., 2015). Cette cinétique suggère un stress initial, comme la lésion de l'injection, déclenchant l'activité de SOD suivie par une baisse provoquée par les lésions engendrées par le pathogène (Duan et al., 2015).

Le niveau d'expression de 4 gènes codant des peptides antimicrobiens (AMPs), la *stylicine*, le facteur antilipopolysaccharide (*ALF*), la pénéidine 3 (*Pen3*) et le lysozyme (*Lys*) a été mesuré. Les niveaux d'expression de ces 4 gènes ne sont pas significativement différents avant l'infection chez les animaux NIC et NIP bien que des modulations soient observées. Ces résultats suggèrent que le probiotique NC201 a un impact faible voire nul sur l'expression des peptides antimicrobiens. Des modulations d'expression ont été observées quel que soit le peptide antimicrobien quantifié suite à l'infection avec *V. nigripulchritudo*. L'expression diminue pour tous ces AMPs à T4 avec une diminution significative pour la *stylicine* chez les animaux IC *vs* NIC, alors qu'en présence de probiotique chez les animaux IP *vs* NIP, l'expression de la *stylicine* et de *ALF* ne sont pas modulées, et l'expression de *Pen3* et *Lys* est diminuée comme pour les animaux IC *vs* NIC. Les modulations observées au cours du temps post infection sont variables selon les gènes d'AMPs, cependant les résultats montrent que l'expression des AMPs est majoritairement plus élevée chez les animaux NIC et IC *vs* NIP et IP. Ces résultats suggèrent que les animaux traités au probiotique sont moins stimulés par l'infection donc moins impactés physiologiquement, ceci laisse penser que les animaux traités au probiotique ont un état physiologique qui leur permet de mieux affronter l'infection. Ces résultats ne laissent pas apparaître que le système immunitaire et plus particulièrement les processus de production des peptides antimicrobiens soient pré-stimulés. A T24, la quantité de probiotique NC201 diminue rapidement dans l'hémolymphe des animaux et inversement la quantité de *Vibrio* augmente (Sorieul et al. in prep – Article 3 de ce manuscrit), l'expression à T4 de *Pen3* semble baisser avec la disparition de NC201 et l'apparition de *Vibrio*, pour *Lys* l'administration des deux bactéries semble également entraîner une baisse de l'expression alors que pour *ALF* l'expression est clairement augmentée par la présence du pathogène, qui induit par contre une baisse de l'expression de *stylicine*. Ces résultats renforcent l'idée que le probiotique confère une protection ou résistance des animaux au *Vibrio* mais qui pourrait n'être que transitoire. Ces résultats démontrent aussi l'importance de tester l'effet d'un probiotique suite à des stress abiotiques pour analyser la modulation de l'expression des gènes au cours du temps. L'expression des peptides antimicrobiens est principalement étudiée suite à des infections par injection chez des animaux sans probiotique et une sur expression est généralement observée suite à un challenge bactérien. Ainsi, l'expression de la *cryptidin-like*, plus tard identifiée comme *stylicine*, est augmentée 24h après une infection avec *V.penaeicida* de Lorgeril et al. (2005), de même une augmentation de l'expression de *ALF* était constatée pendant les premiers 24h chez *F*. *chinensis* après une infection avec *V anguillarum* (Liu et al., 2005). Cependant, alors que chez *L. vannamei* une infection à *V. harveyi* stimule l'expression de *Pen3* (Han-Ching Wang et al., 2010; Nayak et al., 2010), chez *L*.

stylirostris de Lorgeril et al. (2005, 2008) ont montré une sous expression de *Pen3* chez des crevettes non-survivantes à une infection à *V*. *penaeicida* alors qu'aucune modulation de l'expression était observée chez les survivantes. Concernant la modulation de l'expression de *Lys*, l'injection de *V. campbellii* conduit à une diminution du niveau des transcrits dans les hemocytes circulants et dans les tissus périphériques 4h post infection (Burge et al 2007) alors que pour la même période de temps précoce, le signal de lysozyme augmentait dans le muscle au site d'injection. Après 4h, le signal du lysozyme augmentait dans les hémocytes et les tissus circulants. De même, chez *L. vannamei*, une diminution de l'expression était observée suite à une infection par immersion dans de l'eau contenant *V. parahaemolyticus* à 10^3cfu.mL^{-1} pendant les 48h post infection alors qu'avec une dose 10 fois inférieure aucune différence de niveau d'expression était observée (Hong et al., 2016).
Dans notre étude, les tendances observées sur les modulations de l'expression des AMPs sont en accord avec la littérature même si les temps de réaction et l'intensité des réponses varient. Concernant la *stylicine*, la réponse semble plus précoce en présence de probiotique. L'expression d'*ALF* semble directement corrélée à la présence de *Vibrio* dans l'hémolymphe. L'expression de la *Pen3* semble progressivement stimulée par le pathogène chez les animaux témoins alors qu'elle reste basse à 24 h chez les animaux probiotiques. Dans la littérature des profils différents d'expression sont observés suivant les pathogènes utilisés lors des infections (Amparyup et al., 2012; Chen et al., 2015). *Lys* semble sous exprimé chez les animaux probiotiques et peu affectés par le challenge infectieux, la baisse à 4h post infection chez les animaux probiotiques et témoins est cependant en accord avec la littérature. Ces variations peuvent être attribuées au fait que la plupart des auteurs, à l'exception de Hong et al. (2016), font des injections lors des challenges infectieux. Pour rappel, ces AMPs (ALF, stylicine et Pen3) jouent un double rôle dans la réponse immunitaire, ainsi leur activité antimicrobienne peut être directe par lyse de la paroi cellulaire des pathogènes, mais ils peuvent intervenir *via* l'opsonisation et l'agglutination en facilitant la reconnaissance par les hémocytes et ainsi la phagocytose. Les réponses humorales et cellulaires agissent de façon complémentaire.

Influence sur la gestion du stress oxydant

Plusieurs stress peuvent provoquer un déséquilibre de la balance pro-antioxydant. Ainsi les stress abiotique (température, pH, salinité, métaux…) et biotique (infection fongique, bactérienne, virale…) par l'augmentation du métabolisme va provoquer la synthèse de ROS. Ces ROS sont toxiques par leur fort pouvoir oxydant et peuvent être utilisées pour éliminer des molécules ou organismes étrangers (Inada et al., 2012; Xian et al., 2013).
Le système digestif peut constituer une voie d'entrée du pathogène lors de l'infection par balnéation. L'hépatopancréas est alors avec l'estomac le lieu de synthèse de molécules utiles pour la détection et l'élimination des bactéries pathogènes (K. F. Liu et al., 2010). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est une ligne de défense particulièrement efficace car provoque la lyse des pathogènes. Cependant les radicaux libres produits en cascade doivent nécessairement être régulés pour éviter les dommages cellulaires. Cette régulation est réalisée à l'aide d'un arsenal de molécules dites « antioxydantes », enzymes et molécules à fort pouvoir réducteur. L'état physiologique des crevettes peut donc être évalué *via* la capacité de réponse antioxydante qui est indirectement reliée à la réponse immunitaire. L'effet du traitement probiotique avec NC201 a donc été étudié sur la cascade de régulation du stress oxydant dans l'hépatopancréas de crevettes soumises au stress infectieux à *V. nigripulchritudo.*

Lors du métabolisme oxydatif des radicaux sont générés qui en milieu aqueux provoquent la création d'anions superoxydes. Ces anions vont être transformés par la SOD en peroxyde d'hydrogène qui eux même pourront être rendu inertes par l'action de la CAT ou par la GPX. La GPX est une enzyme ayant pour substrat le glutathion, et est capable de contrer la propagation des radicaux lipidiques, rôle que le glutathion peut également remplir. Le glutathion est donc une molécule majeure dans la gestion du stress oxydant par sa capacité à capter le potentiel réducteur en se dimérisant *via* un pont disulfure (GSSG). La glutathion transférase **(**GST) catalyse la conjugaison du glutathion avec d'autres molécules, permettant ainsi la désactivation de radicaux non détoxifiés par les autres enzymes (Nordberg and Arnér, 2001).

Le taux de glutathion total (GSHT) est plus élevé chez les animaux probiotiques, ce pool de glutathion disponible peut être dû à une stimulation de la réponse au stress oxydant par NC201. A l'inverse un taux de GSHT faible chez les animaux témoins indique un déficit en glutathion initial chez ces animaux. La présence initiale de GSSG chez les animaux probiotiques confirme une utilisation de ce glutathion. L'infection à *V. nigripulchritudo* entraîne une synthèse de GSH dans les 24h, plus élevée chez les animaux traités NC201. La production de GSHT est donc stimulée par la souche NC201 et par le pathogène ce qui conduirait à un pool de GSHT supérieur s'additionnant chez les animaux traités infectés. La quantité de GSSG, marqueur de l'activité des enzymes antioxydantes, est similaires pour les animaux infectés témoins et probiotiques 24h post infection. Les deux traitements font donc face au même stress, probablement lié à l'invasion de l'hémolymphe par le pathogène, avec un avantage potentiel pour les animaux probiotiques par leur plus important pool de GSH. Le GSHT est un paramètre peu évalué lors des challenges infectieux chez les pénéides. Il a été néanmoins rapporté que le glutathion réduit présent dans *P. monodon* était diminué dans tous les tissus de l'animal lors d'une infection par le WSSV. Cette baisse s'est également traduite par une baisse de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPX et GST) (Rameshthangam and Ramasamy, 2006). Lors de nos expérimentations, l'infection a stimulé la production de GSH et de sa forme oxydée, elle ne semble cependant pas corrélée à une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes. L'observation de ces paramètres à un temps plus proche de l'apparition des premières mortalités pourrait révéler une défaillance de la balance pro-antioxydante similaire à celle rapportée lors de l'infection au WSSV.
Les enzymes SOD, CAT et GPX forment une cascade de réduction des ROS capable de réduire la forme la plus oxydante, l'anion superoxyde, en des formes moins réactives pour finir à une forme inerte, H_2O. Ces enzymes forment donc la première ligne de défense contre le stress oxydant (Nordberg and Arnér, 2001).
Plusieurs stress pourraient expliquer nos résultats. Le premier serait dû au transfert des animaux il est observable à T0, viendrait ensuite un stress lié au confinement transitoire nécessaire à l'infection, il est visible chez certains paramètres à T4. Enfin le stress lié à l'infection est observable de 4 à 24h post infection.
Le stress de transfert initial, 24h avant l'infection, semble avoir stimulé l'expression de la *SOD* chez les NIP. La catalase (CAT) montre elle une activité stimulée par le transfert, ce stress initial semble avoir un impact plus faible sur les animaux traités avec NC201. Le niveau d'expression initial de la *GST* semble lié à la quantité de GSHT observée, elle est donc supérieure pour les animaux probiotiques. Cette surexpression semble indiquer une stimulation des mécanismes de détoxification chez les animaux probiotiques. La quantité de protéines carbonylées (Carb) est plus élevée chez les animaux probiotiques, ce qui pourrait être dû à la baisse des activités

enzymatiques observées précédemment. La quantité de MDA semble elle aussi initialement élevée mais de façon équivalente chez les deux lots d'animaux.
Tous les traitements montrent la même activité à 4h post infection ce qui pourrait être dû au stress de confinement nécessaire à l'infection auxquels les animaux non infectés sont également été exposés. Chez les animaux probiotiques, 24h post infection, l'activité catalase a récupéré son niveau initialement bas alors que les animaux témoins restent élevés. Similairement à la CAT, l'activité de GPX est moins impactée par les stress de transfert chez les animaux probiotiques, elle semble également stimulée chez tous les animaux par le stress de confinement. Par ailleurs, le confinement des animaux peut apparaître comme une source de stress et affecter l'activité de la SOD ainsi que les niveaux d'expression de la *SOD*, *Cat* et *GPX* chez *L. vannamei* (Lin et al., 2015). En effet ce stress couplé à une infection avec *V*. *alginolyticus* provoque une mortalité supérieure chez les crevettes. L'infection effectuée chez *L*. *stylirostris* passe par une étape augmentant momentanément le confinement et est donc potentiellement source d'un stress supplémentaire pour les animaux.
L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est stimulée chez les animaux probiotiques infectés 24h post infection. L'infection semble aussi générer une légère stimulation de l'activité de la CAT. La glutathion péroxydase (GPX) possède une affinité pour H_2O_2 supérieure à CAT (Duan et al., 2016), elle nécessite cependant le GSH comme cofacteur.
Le niveau d'activité de la GPX est corrélé au niveau d'expression du gène de *GPX*. La SOD et la GPX ne sont pas systématiquement affectées par l'ajout d'un probiotique lors d'un stress infectieux, ainsi *L*. *vannamei* infectée avec *V*. *alginolyticus* et traitée avec un *Bacillus* probiotique n'a révélé aucune variation significative de l'activité de la SOD ou de la GPX (Tseng et al., 2009). L'effet probiotique peut ainsi ne pas déclencher la cascade du stress oxydant. Un autre modèle crustacé, *Artemia*, a permis de montrer qu'une infection avec *V*. *anguillarum* provoquait une chute brutale de l'activité de la SOD et de la GST mais qu'elle pouvait être maintenue par l'ajout d'un probiotique, *B*acillus *subtilis* (Giarma et al., 2017). Une baisse des activités des enzymes antioxydantes n'est pas obligatoirement due à un effet néfaste sur l'animal, ainsi chez *F*. *chinensis* l'utilisation de biofloc a provoqué une baisse de l'activité de la CAT et de la SOD alors que les performances de croissance était supérieures pour les animaux traités (Kim et al., 2015). Des précautions doivent cependant être prises lors de la comparaison avec des résultats déjà publiés car les conditions expérimentales peuvent avoir un effet important sur le niveau d'activité des enzymes antioxydantes, ainsi un effet de l'injection a été observé chez *L*. *vannamei* lors de challenge avec le WSSV (Parrilla-Taylor et al., 2013).
La stimulation de l'expression de la *SOD* dans l'hépatopancréas semble corrélée à la présence de bactéries dans l'hémolymphe 4h post infection indépendamment de la présence de probiotique, cependant à 24h l'expression ne semble pas être affectée par l'infection et est plus basse chez les animaux probiotiques mais est concomitante à l'entrée plus importante de *Vibrio* dans l'hémolymphe qui peut contribuer à inhiber l'activité ou fonctionnalité des hémocytes circulants ou infiltrés. L'activité de la SOD ne semble pas corrélée à l'expression de la *SOD* mesurée, ceci pourrait être dû au fait que seule l'expression de *MnSOD* est mesurée alors que l'activité représente l'activité des SOD. Il est probable que la MnSOD ne représente pas l'activité des SOD présentes dans l'hépatopancréas. L'expression de *Cat* est potentiellement stimulée par la présence de H_2O_2 qui peut provenir de l'activité de la SOD. A 24h l'expression de *Cat* semble impactée par l'infection avec le pathogène, ce qui pourrait s'expliquer comme précédemment par une baisse d'activité des hémocytes. Le fait que l'activité de la CAT ne semble pas corrélée au niveau d'expression de *Cat*, suggère que des mécanismes sous-jacents non expliqués régulent l'expression et l'activité de la catalase. Il a

été cependant observé chez *L*. *vannamei* une corrélation entre les niveaux d'expression des enzymes antioxydantes *SOD*, *Cat* et *GPX* et leur niveau d'activité lors de challenge avec *V*. *alginolyticus* (Chen et al., 2015).
Suite à la stimulation initiale l'expression de *GST* n'est pas significativement affectée par le probiotique ou le pathogène. Cette observation ne permet cependant pas de conclure sur l'activité de la GST, il se pourrait que la synthèse initiale soit suffisante ou que d'autres mécanismes antioxydants agissent en amont après le transfert des animaux. Chez *L*. *stylirostris* soumise à un stress oxydant une baisse du niveau d'expression de la *GST* a été observée, l'élevage en biofloc ayant permis un maintien du niveau d'expression (Cardona et al., 2015).
La quantité de MDA semble initialement élevée, rejoignant les indicateurs stimulés par le stress de transfert, par la suite elle baisse de façon homogène chez tous les animaux 24h post infection. Les protéines Carb et MDA sont des produits de dégradation oxydative des protéines et des lipides, respectivement. Lors d'une infection, les pathogènes peuvent affecter l'activité des enzymes antioxydantes, comme vu chez *Artemia*, et ainsi conduire à une forte hausse de MDA (Giarma et al., 2017), mais dans notre étude l'ajout de probiotique ayant permis un maintien de l'activité de ces enzymes, cette hausse n'a pas été observée chez les animaux probiotiques. Leur présence dans les cellules témoigne donc d'une défaillance des mécanismes de contrôle du stress oxydant. Le fait que le taux de protéines Carb soit élevé chez les animaux probiotiques alors que le taux de la MDA est équivalent aux témoins à T0, et que les activités et niveaux d'expression des enzymes antioxydantes ont des tendances opposées, indique que la cascade de détoxification des ROS n'est pas uniformément affectée par le probiotique ou le pathogène.
Le taux de GSHT/GSSG étant similaire chez les animaux infectés, leur production et recyclage ne semblent pas affectés par les traitements. Si le substrat principal des enzymes de détoxification n'est pas en cause, les dommages observés sont potentiellement dus à une activité insuffisante des enzymes antioxydantes. La GPX en particulier peut être considérée comme la dernière ligne de défense contre la propagation du stress oxydant et l'apparition de Carb et MDA. Cependant le découplage entre activité et expression de la *GPX* ne nous permet pas de conclure si l'apparition de Carb et MDA est due à une défaillance de l'activité de cette enzyme. Un suivi sur un temps plus long permettrait de se rapprocher de l'apparition des mortalités et peut être d'observer une défaillance claire des systèmes antioxydants et une augmentation significative des marqueurs de la dégradation oxydative.

L'ensemble des résultats obtenus ont conduit à formuler deux hypothèses principales pour expliquer le mode d'action de NC201 chez *L*. *stylirostris* et l'amélioration des survies lors des stress biotiques et abiotiques.

Hypothèse 1 : compétition directe avec *V*. *nigripulchritudo*
La première hypothèse est basée sur une inhibition directe de NC201 sur les pathogènes de *L*. *stylirostris*. La souche NC201, *Pseudoalteromonas*, agirait *via* les molécules antibactériennes qu'elle est susceptible de produire. Son génome a révélé de nombreux clusters potentiellement antibactériens. Cette activité antibactérienne de NC201 a été observée contre plusieurs *Vibrio*, *V*. *penaeicida*, *V*. *nigripulchritudo* et *V*. *alginolyticus*, cette activité pourrait être due à divers molécules. Une de ces molécules a été identifiée, la LodA-like, son mode d'action est très probablement lié à la synthèse de peroxyde d'hydrogène. La souche NC201 possède ainsi un arsenal de molécules antimicrobiennes susceptibles d'avoir une action vis-à-vis des *Vibrio*. La souche NC201 est également capable d'envahir l'hémolymphe

de la crevette sans provoquer de mortalité, ses molécules actives, si elles sont synthétisée dans la crevette, ne seraient donc pas délétères pour l'animal et pourraient potentiellement être véhiculées par son système vasculaire.
V. nigripulchritudo est lui aussi capable de coloniser rapidement l'hémolymphe de *L. stylirostris,* mais sa présence est rapidement liée à de fortes mortalités des crevettes. En effet, l'infection de crevettes traitées au probiotique NC201, a montré pendant les premières 24h post infection un faible taux de NC201 ainsi que de *Vibrio* dans l'hémolymphe comparativement aux animaux contrôles respectifs. Le probiotique et le pathogène semblent donc s'exclure mutuellement dans l'hémolymphe de la crevette. Ceci suggère une action directe de NC201 sur *Vibrio.* Cette constatation conduit à penser que le probiotique NC201 pourrait agir par compétition avec la flore bactérienne et en particulier le *Vibrio* pathogène. Lors de l'infection, les mortalités ont été observées 48h après l'apparition de pathogènes dans l'hémolymphe. Le retard de 24h de la colonisation par *V. nigripulchritudo* de l'hémolymphe chez les animaux probiotiques semble correspondre au retard d'apparition de 24h des mortalités chez ces mêmes animaux. La localisation de cette potentielle compétition voire inhibition entre bactéries probiotiques et pathogènes reste à déterminer. Le probiotique est administré dans l'eau 4h avant l'infection par balnéation, et après l'exposition de 2h des crevettes au pathogène l'eau est renouvelée à 100%. A la suite de ce renouvellement les bactéries, NC201 et *V. nigripulchritudo*, sont en quantité beaucoup plus faible dans l'eau. Les bactéries restantes ne pouvant assurer l'entrée constante de bactéries dans l'animal ceci expliquerait suite à la forte colonisation initiale, la disparition de NC201 dans l'hémolymphe. Sa disparition progressive serait due à une incapacité à se maintenir et proliférer dans l'hémolymphe. Le pathogène est lui par contre capable de se maintenir dans l'hémolymphe ce qui implique une capacité à proliférer dans l'hémolymphe et/ou une capacité à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Une compétition dans l'hémolymphe aurait des conséquences directes sur l'hôte, en particulier si l'activité de NC201 est due à une production de peroxyde d'hydrogène, or une stimulation de la superoxyde dismutase a été révélée qui pourrait être un mécanisme de compensation de cette synthèse. Une inhibition dans l'hôte aurait également pour conséquence la présence de déchets cellulaires bactériens qui pourraient stimuler les défenses immunitaires, ce phénomène pourrait être à l'origine de la stimulation de l'expression des LGBP 24h post infection. Une lyse de NC201 pourrait d'ailleurs être à l'origine de l'augmentation de la SOD observée dans l'hémolymphe 4h post infection.
Le fait que les deux bactéries ne s'observent pas en grande proportion en même temps dans l'hémolymphe soulève la question de l'effet de l'infection sur la présence de NC201 dans l'hémolymphe. Une inhibition directe par *Vibrio* semble peu probable compte tenu des résultats des tests d'inhibition et de coculture, NC201 croît en présence de *Vibrio* et devient l'espèce dominante en milieu liquide. L'effet inhibiteur du surnageant de la NC201 sur *V. nigripulchritudo* ainsi que l'inhibition de la croissance de ce *Vibrio* par la bactérie NC201 est probablement dû à plusieurs molécules excrétées par NC201. La disparition de NC201 de l'hémolymphe à T24 permet au pathogène de coloniser ce site. Le *Vibrio* capable de sécréter la nigritoxine peut être responsable de la mort des hémocytes par apoptose (Labreuche et al., 2017). Cette mort des hémocytes va diminuer la réponse immunitaire et favoriser l'envahissement de la crevette par les *Vibrio*. L'hémolymphe n'est pas un milieu optimal de vie pour NC201 et deux hypothèses pourraient expliquer sa disparition accélérée par *Vibrio*. La première serait due au fait que le peroxyde d'hydrogène généré par NC201 lui est également toxique. La deuxième impliquerait une inhibition indirecte par *Vibrio*, le pathogène

pourrait déclencher une réponse immunitaire à laquelle il est capable d'échapper alors que pas la souche NC201, qui seul ne semble pas déclencher de réponse.
On ne peut pas non plus négliger la possibilité que le flux de bactéries dans l'hémolymphe soit une conséquence de phénomènes survenant à l'interface, entre l'animal et le milieu, permettant l'entrée des bactéries dans l'hémolymphe. Une étude de la flore bactérienne d'autres tissus pourrait révéler la présence et le maintien de ces bactéries dans l'animal.

Hypothèse 2 : La souche NC201 améliorerait l'état de santé général de la crevette
Une autre hypothèse est basée sur un effet indirect du probiotique qui pourrait stimuler/renforcer l'état de santé général de l'animal lui conférant une meilleure résistance à l'infection au pathogène. L'effet bénéfique de l'administration de NC201 avait été démontré dans les travaux antérieurs à cette thèse par l'augmentation de la croissance et de l'indice de développement des larves traitées au probiotique. Ce probiotique a également eu un effet protecteur sur les animaux exposés à des stress hyper et hyposalins se traduisant par une augmentation des survies lors de l'administration de probiotique. L'amélioration de l'état de santé général signifie que les animaux sont capables de mobiliser plus de ressources pour répondre à un stress. Cette augmentation des ressources disponibles peut être due à un apport nutritif du probiotique ou une libération des ressources utilisées pour la gestion de stress continus, comme le stress oxydatif lié au métabolisme, permettant leur remobilisation dans d'autres voies. L'amélioration de l'osmorégulation chez les animaux probiotiques pourrait être expliquée par cet effet probiotique. Cette amélioration des capacités osmorégulatrices des animaux ne peut pas être directement attribuée à NC201.
Les résultats obtenus après un stress infectieux ont révélé un niveau d'expression initial des gènes immunitaires supérieur chez les animaux témoins, suggérant un niveau de stress supérieur. Il est possible que ces niveaux d'expression plus élevés dus au stress aient empêché l'observation de variations liées au traitement probiotique lors de l'infection. Cependant la récupération du stress de transfert a été plus rapide chez les animaux traités au probiotique. Le traitement au probiotique augmenterait donc la résistance des animaux, ce qui est également un effet probiotique recherché. Les taux de survies augmentés seraient alors la conséquence d'une augmentation de la capacité de *L. stylirostris* à gérer ces stress. Une période de stabulation plus longue pourrait permettre de voir disparaître l'effet stressant du transfert ce qui contrasterait l'effet lié à l'infection. Le biais potentiel du stress de confinement lié à la méthode d'infection serait alors potentiellement plus visible. La réponse immunitaire ne semble, de façon globale, pas stimulée par le probiotique alors que certains probiotiques, notamment les Gram positif, sont capables d'activer la cascade de mélanisation (Chai et al., 2016; K.-F. Liu et al., 2010; Zokaeifar et al., 2014, 2012b).
En ce qui concerne les mécanismes de réponse au stress oxydant, les niveaux d'activité et d'expression des enzymes impliquées sont différemment affectés par l'administration de probiotique et l'infection. Ce qui laisse supposer que le probiotique affecte seulement quelques mécanismes spécifiques. Ainsi les mécanismes liés à la détoxification des ROS, à savoir *SOD*, *CAT* et *GPX*, sont initialement sous exprimés chez les animaux probiotiques, alors que les voies de détoxification de la *GST* et la quantité initiale de GSH semblent stimulées. Les marques de dommages liés à une oxydation sont elles aussi contrastées, les animaux probiotiques semblent plus affectés par l'oxydation des protéines alors qu'aucune différence n'est observée entre les animaux en ce qui concerne les dégâts lipidiques. Une hypothèse pourrait être que les animaux probiotiques étant moins stressés leur métabolisme génère moins de ROS provocant indirectement une baisse de l'activité et de l'expression de ces

enzymes. De même cette absence de stress pourrait permettre aux animaux probiotiques d'utiliser l'énergie dans la synthèse de glutathion et ce surplus de glutathion provoquerait une surexpression de la *GST*.
Cependant les dommages indiqués par la quantité de protéines carbonylées et de lipides peroxydés semblent indiquer une exposition à des ROS chez les animaux probiotiques. Ces ROS pourraient provenir de l'activité antibactérienne de NC201 ou avoir été générés lors du stress de transfert des animaux *via* une augmentation transitoire du métabolisme. La stimulation de néosynthèse de GST concorde avec un besoin de détoxification de molécules oxydées (notamment sous forme d'hydropéroxyde).
L'amélioration de cette réponse semble surtout due à une augmentation de l'état de santé général de l'animal, qui peut alors allouer plus d'énergie et de ressources à la réponse contre le stress oxydant que les animaux non traités.

Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives. Pendant les premières 24h d'infection, la lyse des *Vibrio* par NC201 pourrait exposer des fragments cellulaires bactériens reconnus par le système immunitaire de la crevette alors que les *Vibrio* seuls maintiennent leur intégrité cellulaire, conservent leur mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire. Les deux phénomènes expliquant l'effet probiotique peuvent donc avoir lieu simultanément et même avoir un effet synergique *via* l'affaiblissement de la capacité infectieuse des pathogènes, par une diminution de leur charge, et l'augmentation de la réponse immunitaire.

Perspectives

Ces travaux ont permis de confirmer l'effet probiotique et d'identifier des mécanismes potentiels d'action de la souche NC201. Les futurs travaux peuvent suivre deux objectifs, le premier viserait à approfondir la recherche et la compréhension des mécanismes engendrant cet effet probiotique, gains de survie et de résilience des animaux. . Le deuxième serait axé vers la mise en place d'une stratégie d'utilisation de ce probiotique pour une application dans la filière de la crevetticulture. Pour cela un outil de suivi de NC201 dans le milieu d'élevage serait d'une grande aide. Grâce au génome, un outil de détection moléculaire, basé sur l'amplification de multiples régions répétées en tandem, a été conceptualisé. Sa mise au point permettrait de s'affranchir des fastidieux isolements bactériens et de gagner en puissance de détection, présence de NC201 détectable dans des pools d'ADN bactériens extraits, et en discrimination puisque l'identification est « souche spécifique ».
D'autres perspectives à court terme seraient dans la continuité des travaux d'identification des molécules antibactériennes de la souche NC201, car la nature des molécules inhibitrices de faible poids moléculaire reste inconnue et certains composés cycliques bromés sont déjà identifiés chez *P*. *flavipulchra* JG1 (Yu et al., 2012b), très proche de la souche NC201. Naturellement les autres molécules, telles que les alkaloïdes et les peptides antimicrobiens, citées pat Offret et al. (2016) sont aussi à prendre en compte, tout comme la possibilité que le pigment orange de NC201 soit lui aussi porteur d'activité comme c'est le cas chez *P*. *tunicata* et son pigment jaune, la tambjamine (Cavalcanti et al., 2008; Franks et al., 2005). Des clusters antimicrobiens identifiés chez NC201 semblent ainsi coder pour la synthèse de gramicidine, un antibiotique connu. Les travaux initiaux d'optimisation des conditions de culture pour la synthèse de ces composés antimicrobiens seraient également à approfondir. Leur production en grande quantité dans pourrait également servir à déterminer si l'administration de ces

composés seuls est suffisante à reproduire l'effet probiotique ou si la présence de NC201 vivantes est nécessaire.

A moyen terme, il pourrait être intéressant de tester le potentiel probiotique de NC201 dans le cadre d'infection à *V. penaeicida*, un autre pathogène majeur de *L. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie. Ce pathogène déclenche des mortalités dans des conditions environnementales différentes de *V. nigripulchritudo*. L'état physiologique des crevettes est alors également différent comme observés lors du syndrome d'été et d'hiver. Ces conditions différentes et potentiels mécanismes pathogènes différents peuvent engendrer une réponse différente des animaux. Dans ce cadre il est possible que NC201 ait une activité différente. Il serait donc intéressant si l'effet probiotique est conservé car cela permettrait d'élargir le champ d'utilisation de NC201.

Afin de pouvoir appliquer ce probiotique aux élevages calédoniens, des stratégies d'utilisation sont à explorer, il faut notamment développer un produit industriel. Le mode d'administration sous une forme autre qu'une culture bactérienne est probablement à développer, ainsi la quantité à administrer. Par ailleurs, la posologie est-elle à adapter en fonction du stade de développement ou du poids des animaux ? Une administration dans l'eau ou dans l'aliment sont-elles différentes ? Il se pourrait également que l'administration de probiotiques impacte l'assimilation des aliments par la crevette, une meilleure assimilation pouvant conduire à de meilleurs rendements qui serait un effet bénéfique.
Une fois une stratégie de production et de distribution établie au niveau calédonien, l'utilisation de ce probiotique pourrait être étendu à d'autres espèces de pénéides. Les méthodes de production étant différentes de celles employées pour *L. stylirostris*, cette nouvelle application de NC201 nécessiterait une adaptation des méthodes d'administration ainsi que la posologie.

Références bibliographiques

Abu Hena, M.., Sharifuzzaman, S.., Hishamuddin, O., Misri, K., Abdullah, F., Hena Abu, M.., 2008. Pond Health Management of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius) using Bacterial Products. Dis. Asian Aquac. VI. Fish Heal. Sect. 469–476.

Adams, C. a, 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. Nutr. Res. Rev. 23, 37–46. doi:10.1017/S0954422410000090

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. pp. 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3

Afsal, V. V., Antony, S.P., Philip, R., Bright Singh, I.S., 2016. Molecular Characterization of a Newly Identified Subfamily Member of Penaeidin from two Penaeid Shrimps, *Fenneropenaeus indicus* and *Metapenaeus monoceros*. Probiotics Antimicrob. Proteins 8, 46–52. doi:10.1007/s12602-015-9203-9

Aguirre-Guzmán, G., Vázquez-Juárez, R., Ascencio, F., 2001. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *vibrio* species. J. Invertebr. Pathol. 78, 215–219. doi:10.1006/jipa.2001.5073

Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D., 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. J. Appl. Microbiol. 100, 1103–1113. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02812.x

Alday-Sanz, V., Roque, A., Turnbull, J.F., 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp Penaeus monodon. Dis Aquat Organ 48, 91–99. doi:10.3354/dao048091

Alderman, D.J., Hastings, T.S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. Int. J. Food Sci. Technol. doi:10.1046/j.1365-2621.1998.3320139.x

Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 33, 247–256. doi:10.1016/j.dci.2008.09.003

Amparyup, P., Sutthangkul, J., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2012. Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β-1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. J. Biol. Chem. 287, 10060–10069. doi:10.1074/jbc.M111.294744

Antony, S.P., Singh, I.S.B., Sudheer, N.S., Vrinda, S., Priyaja, P., Philip, R., 2011. Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. Immunobiology 216, 184–94. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.030

Aruoma, O.I., Whiteman, M., England, T.G., Halliwell, B., 1997. Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. Biochem. Biophys. Res. Commun. 231, 389–391. doi:10.1006/bbrc.1997.6109

Austin, B., 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. Vet. Microbiol. 140, 310–317. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.015

Austin, B., Zhang, X.H., 2006. Vibrio harveyi: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Lett. Appl. Microbiol. 43, 119–124. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x

Bachère, E., 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: Potential tools for disease control in larviculture. Aquaculture 227, 427–438. doi:10.1016/S0044-8486(03)00521-0

Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191, 3–11. doi:10.1016/S0044-8486(00)00413-0

Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol. Rev. 198, 149–168. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x

Bachère, E., Mialhe, E., Rodriguez, J., 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. Fish Shellfish Immunol. 5, 597–612. doi:10.1016/S1050-4648(95)80044-1

Balcázar, J.L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol. 114, 173–186. doi:10.1016/j.vetmic.2006.01.009

Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A.C., Márquez, I., Gironés, O., Muzquiz, J.L., 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (Salmo trutta). Br. J. Nutr. 97, 522–527. doi:10.1017/S0007114507432986

Ballestriero, F., Thomas, T., Burke, C., Egan, S., Kjelleberg, S., 2010. Identification of compounds with bioactivity against the nematode *Caenorhabditis elegans* by a screen based on the functional genomics of the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* D2. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5710–5717. doi:10.1128/AEM.00695-10

Barbieri, E., Barry, K., Child, A., Wainwright, N., 1997. Antimicrobial activity in the microbial community of the accessory nidamental gland and eggs of *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). Science (80-.). 2216, 275–276.

Barbieri, E., Paster, B.J., Hughes, D., Zurek, L., Moser, D.P., Teske, A., Sogin, M.L., 2001. Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (*Cephalopoda*: *Loliginidae*). Environ. Microbiol. 3, 151–167. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00172.x

Boonanuntanasarn, S., Wongsasak, U., Pitaksong, T., Chaijamrus, S., 2016. Effects of dietary supplementation with β-glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp. Aquac. Nutr. 22, 837–845. doi:10.1111/anu.12302

Bosi, E., Fondi, M., Orlandini, V., Perrin, E., Maida, I., de Pascale, D., Tutino, M.L., Parrilli, E., Lo Giudice, A., Filloux, A., Fani, R., 2017. The pangenome of (Antarctic) *Pseudoalteromonas* bacteria: evolutionary and functional insights. BMC Genomics 18, 93. doi:10.1186/s12864-016-3382-y

Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, J.-P., Trilles, J.-P., Charmantier, G., 1994. Ontogeny of Osmoregulatory Stuctures in the Shrimp *Penaeus japonicus* (*Crustacea*, *Decapoda*). Biol. Bull. 186, 29–40.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish Shellfish Immunol. 19, 457–472. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.008

Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., Phillips, M., 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and Penaeus stylirostris in Asia and the Pacific. FAO 14–25. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2

Brown, M., 2011. Modes of action of probiotics: Recent developments. J. Anim. Vet. Adv. doi:10.3923/javaa.2011.1895.1900

Burge, E.J., Madigan, D.J., Burnett, L.E., Burnett, K.G., 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with Vibrio. Fish Shellfish Immunol. 22, 327–39. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.004

Burke, C., Thomas, T., Egan, S., Kjelleberg, S., 2007. The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*: Brief report. Environ. Microbiol. 9, 814–818. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01177.x

Carbone, M., Irace, C., Costagliola, F., Castelluccio, F., Villani, G., Calado, G., Padula, V., Cimino, G., Lucas Cervera, J., Santamaria, R., Gavagnin, M., 2010. A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch *Tambja ceutae*. Bioorganic Med. Chem. Lett. 20, 2668–2670. doi:10.1016/j.bmcl.2010.02.020

Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguier, F., Saulnier, D., 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. BMC Microbiol. 16, 157. doi:10.1186/s12866-016-0770-z

Cardona, E., Saulnier, D., Lorgeoux, B., Chim, L., Gueguen, Y., 2015. Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial transcriptional response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress. Fish Shellfish Immunol. 45, 933–939. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.041

Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.L., Schmidely, P., Mariojouls, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. Aquaculture 275, 182–193. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.01.011

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. Fish Shellfish Immunol. 28, 622–631. doi:10.1016/j.fsi.2009.12.024

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture 294, 306–313. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.06.016

Cavalcanti, B.C., Júnior, H.V.N., Seleghim, M.H.R., Berlinck, R.G.S., Cunha, G.M.A., Moraes, M.O., Pessoa, C., 2008. Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on Chinese hamster lung fibroblasts. Chem. Biol. Interact. 174, 155–162. doi:10.1016/j.cbi.2008.05.029

Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends Immunol. 29, 263–271. doi:10.1016/j.it.2008.02.009

Chai, P.C., Song, X.L., Chen, G.F., Xu, H., Huang, J., 2016. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol. doi:10.1016/j.fsi.2016.05.011

Chalkiadakis, E., Dufourcq, R., Schmitt, S., Brandily, C., Kervarec, N., Coatanea, D., Amir, H., Loubersac, L., Chanteau, S., Guezennec, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Simon-Colin, C., 2013. Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *vibrio neocaledonicus* sp. nov., from new caledonia. J. Appl. Microbiol. 114, 1702–1712. doi:10.1111/jam.12184

Chaosomboon, A., Phupet, B., Rattanaporn, O., Runsaeng, P., Utarabhand, P., 2017. Lipopolysaccharide- and β-1,3-glucan-binding protein from *Fenneropenaeus merguiensis*

functions as a pattern recognition receptor with a broad specificity for diverse pathogens in the defense against microorganisms. Dev. Comp. Immunol. 67, 434–444. doi:10.1016/j.dci.2016.07.006

Chen, W.M., Lin, C.Y., Chen, C.A., Wang, J.T., Sheu, S.Y., 2010. Involvement of an l-amino acid oxidase in the activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas flavipulchra* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Enzyme Microb. Technol. 47, 52–58. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.03.008

Chen, Y.Y., Chen, J.C., Tseng, K.C., Lin, Y.C., Huang, C.L., 2015. Activation of immunity, immune response, antioxidant ability, and resistance against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* decrease under long-term culture at low pH. Fish Shellfish Immunol. 46, 192–199. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.055

Cheng, W., Liu, C.-H., Tsai, C.-H., Chen, J.-C., 2005a. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 18, 297–310. doi:10.1016/j.fsi.2004.08.002

Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., Chen, J.C., 2005b. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 18, 1–12. doi:10.1016/j.fsi.2004.03.002

Cheng, W., Wang, C.H., 2001. The susceptibility of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae* and its resistance under copper sulfate stress. Dis. Aquat. Organ. 47, 137–144. doi:10.3354/dao047137

Chiu, C.-H., Guu, Y.-K., Liu, C.-H., Pan, T.-M., Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish Shellfish Immunol. 23, 364–77. doi:10.1016/j.fsi.2006.11.010

Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legroumellec, M., Grimont, P., 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. Aquaculture 164, 297–309. doi:10.1016/S0044-8486(98)00195-1

Coutelle, C., Iron, A., Higueret, D., Cassaigne, A., 1992. OPTIMIZATION OF SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TOTAL SANGUINE GLUTATHIONE AND OXIDE - COMPARISON WITH A FLUOROMETRIC METHOD. Ann. Biol. Clin. (Paris). 50, 382–382.

Cuthbertson, B.J., Büllesbach, E.E., Fievet, J., Bachère, E., Gross, P.S., 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. Biochem. J. 381, 79–86. doi:10.1042/BJ20040330

Das, S., Lyla, P.S., Ajmal Khan, S., 2006. Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of Penaeus monodon (Fabricius). Isr. J. Aquac. - Bamidgeh 58, 198–204.

De, B.C., Meena, D.K., Behera, B.K., Das, P., Das Mohapatra, P.K., Sharma, A.P., 2014. Probiotics in fish and shellfish culture: Immunomodulatory and ecophysiological responses. Fish Physiol. Biochem. 40, 921–971. doi:10.1007/s10695-013-9897-0

de la Vega, E., García-Galaz, A., Díaz-Cinco, M.E., Sotelo-Mundo, R.R., García-Galaz, A., Díaz-Cinco, M.E., Sotelo-Mundo, R.R., 2006. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: Vibrio alginolyticus, *Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio cholerae*. Fish Shellfish Immunol. 20,

405–408. doi:10.1016/j.fsi.2005.06.005
de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Goarant, C., Goyard, E., Mugnier, C., Fievet, J., Piquemal, D., Bachère, E., 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. Mol. Immunol. 45, 3438–3445. doi:10.1016/j.molimm.2008.04.002
de Lorgeril, J., Saulnier, D., Janech, M.G., Gueguen, Y., Bachère, E., 2005. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. Physiol. Genomics 21, 174–183. doi:10.1152/physiolgenomics.00281.2004
de Paiva-Maia, E., Alves-Modesto, G., Otavio-Brito, L., Olivera, A., Cristina Vasconcelos-Gesteira, T., Paiva Maia, E., 2013. Effect of probiotic on bacterial and phytoplankton Effect of a commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. J. Aquat. Res 41, 126–137. doi:10.3856/vol41-issue1-fulltext-10
Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16, 1058–1071. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.026
Defer, D., Desriac, F., Henry, J., Bourgougnon, N., Baudy-Floc'h, M., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2013. Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: the bacterial connection. Fish Shellfish Immunol. 34, 1439–47. doi:10.1016/j.fsi.2013.03.357
Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T.K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2006. Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6419–6423. doi:10.1128/AEM.00753-06
Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. Mar. Drugs 8, 1153–77. doi:10.3390/md8041153
Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, A. Van, Rodriguez, J., Bachère, E., 1997. Penaeidins , a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus* Penaeidins , a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus* vannamei (Decapoda). J. Biol. Chem. 272, 28398–28406. doi:10.1074/jbc.272.45.28398
Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachère, E., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. J. Cell Sci. 113 (Pt 3, 461–469. doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.010
Devaraja, T., Banerjee, S., Yusoff, F., Shariff, M., Khatoon, H., 2013. A holistic approach for selection of Bacillus spp. as a bioremediator for shrimp postlarvae culture. Turkish J. Biol. 37, 92–100. doi:10.3906/biy-1203-19
Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. pp. 421–431. doi:10.1016/0076-6879(90)86135-I
Du, X.-J., Zhao, X.-F., Wang, J.-X., 2007. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). Mol. Immunol. 44, 1085–94. doi:10.1016/j.molimm.2006.07.288
Duan, Y., Liu, P., Li, J., Li, J., Chen, P., 2013. Expression profiles of selenium dependent

glutathione peroxidase and glutathione S-transferase from *Exopalaemon carinicauda* in response to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge. Fish Shellfish Immunol. 35, 661–670. doi:10.1016/j.fsi.2013.05.016

Duan, Y., Zhang, J., Dong, H., Wang, Y., Liu, Q., Li, H., 2016. Effect of desiccation and resubmersion on the oxidative stress response of the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Fish Shellfish Immunol. 49, 91–99. doi:10.1016/j.fsi.2015.12.018

Duan, Y., Zhang, J., Dong, H., Wang, Y., Liu, Q., Li, H., 2015. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. Fish Shellfish Immunol. 46, 354–365. doi:10.1016/j.fsi.2015.06.032

Dufourcq, R., Chalkiadakis, E., Fauchon, M., Deslandes, E., Kerjean, V., Chanteau, S., Petit, E., Guezennec, J., Dupont-Rouzeyrol, M., 2014. Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine costal environment from New Caledonia. Lett. Appl. Microbiol. 58, 102–8. doi:10.1111/lam.12162

Fagutao, F.F., Maningas, M.B.B., Kondo, H., Aoki, T., Hirono, I., 2012. Transglutaminase regulates immune-related genes in shrimp. Fish Shellfish Immunol. 32, 711–715. doi:10.1016/j.fsi.2012.01.018

Fan, L., Wang, A., Wu, Y., 2013. Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. Proteomics 80, 196–206. doi:10.1016/j.jprot.2012.12.017

FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA).

FAO, 2001. Probiotics in food. Food Nutr. Pap. 85, 71. doi:10.1201/9781420009613.ch16

Ferreira, G.S., Bolívar, N.C., Pereira, S.A., Guertler, C., Vieira, F. do N., Mouriño, J.L.P., Seiffert, W.Q., 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 448, 273–279. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.06.006

Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. Dev. Comp. Immunol. 31, 217–231. doi:10.1016/j.dci.2006.06.009

Franco, R., Martín, L., Arenal, A., Santiesteban, D., Sotolongo, J., Cabrera, H., Mejías, J., Rodríguez, G., Moreno, A.G., Pimentel, E., Castillo, N.M., 2016. Evaluation of two probiotics used during farm production of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Crustacea*: *Decapoda*). Aquac. Res. n/a-n/a. doi:10.1111/are.13031

Franks, A., Egan, S., Holmström, C., James, S., Lappin-Scott, H., Kjelleberg, S., 2006. Inhibition of fungal colonization by *Pseudoalteromonas tunicata* provides a competitive advantage during surface colonization. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6079–6087. doi:10.1128/AEM.00559-06

Franks, A., Haywood, P., Holmström, C., Egan, S., Kjelleberg, S., Kumar, N., 2005. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *pseudoalteromonas tunicata*, in: Molecules. pp. 1286–1291. doi:10.3390/10101286

Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol. 201, 1203–9. doi:10.1242/jeb.037663

Fuller, R., 1995. Probiotics: their development and use. Old Herborn Univ. Semin. Monogr. 8, 1–8.

Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365–378. doi:10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x

Gatesoupe, F.J., 1999. The use of Probiotics in Aquaculture. Aquaculture 180, 147–165.

Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R., 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of tw. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 755–761. doi:10.1099/00207713-45-4-755

Giarma, E., Amanetidou, E., Toufexi, A., Touraki, M., 2017. Defense systems in developing *Artemia franciscana* nauplii and their modulation by probiotic bacteria offer protection against a *Vibrio anguillarum* challenge. Fish Shellfish Immunol. 66, 163–172. doi:10.1016/j.fsi.2017.05.008

Gillett, R., 2008. Global study of shrimp fisheries. Fish. Bethesda 475, 331 pp.

Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006. "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. Aquaculture 253, 105–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.031

Goarant, C., Régnier, F., Brizard, R., Marteau, A.L., 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. Aquaculture 169, 291–296. doi:10.1016/S0044-8486(98)00380-9

Gómez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C. V., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G., 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. Dev. Comp. Immunol. 30, 893–900. doi:10.1016/j.dci.2006.01.002

Goncalves, P., Guertler, C., Bachère, E., de Souza, C.R.B., Rosa, R.D., Perazzolo, L.M., 2014. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. Dev. Comp. Immunol. 42, 294–301. doi:10.1016/j.dci.2013.09.017

Goudenège, D., Labreuche, Y., Krin, E., Ansquer, D., Mangenot, S., Calteau, A., Médigue, C., Mazel, D., Polz, M.F., Le Roux, F., 2013. Comparative genomics of pathogenic lineages of *Vibrio nigripulchritudo* identifies virulence-associated traits. ISME J. 7, 1985–1996. doi:10.1038/ismej.2013.90

Goulden, E.F., Hall, M.R., Pereg, L.L., Høj, L., 2012. Identification of an antagonistic probiotic combination protecting ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) larvae against *Vibrio owensii* infection. PLoS One 7. doi:10.1371/journal.pone.0039667

Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I., Al, G.E.T., Icrobiol, A.P.P.L.E.N.M., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2 , a Possible Probiotic Treatment of Fish. Appl. Environ. Microbiol. 65, 969–973.

Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Paci®c White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. Environ. Sci. 25.

Günzler, W.A., Kremers, H., Floha, L., 1974. An Improved Coupled Test Procedure for Glutathione Peroxidase (EC 1 . 11 , 1 . 9 .) in Blood Glutathione peroxidase has been widely accepted as an integral part of the cellular antioxidative system (1 — 4) and , recently , has turned out to be a seleno. Clin. Chem. Lab. Med. 12, 444–448.

Guo, H., Xian, J.-A., Wang, A.-L., 2016. Analysis of digital gene expression profiling in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress. Fish Shellfish Immunol. 56, 1–11. doi:10.1016/j.fsi.2016.06.059

Hai, N. Van, Buller, N., Fotedar, R., 2009a. Effects of probiotics (*pseudomonas synxantha* and

pseudomonas aeruginosa) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*penaeus latisulcatus* kishinouye, 1896). Aquac. Res. 40, 590–602. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02135.x

Hai, N. Van, Buller, N., Fotedar, R., 2009b. The use of customised probiotics in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). Fish Shellfish Immunol. 27, 100–4. doi:10.1016/j.fsi.2009.05.004

Halliwell, B., Gutteridge, J., 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press.

Han-Ching Wang, K., Tseng, C.-W., Lin, H.-Y., Chen, I.-T., Chen, Y.-H., Chen, Y.-M., Chen, T.-Y., Yang, H.-L., 2010. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. Dev. Comp. Immunol. 34, 49–58. doi:10.1016/j.dci.2009.08.003

Hao, K., Liu, J.-Y., Ling, F., Liu, X.-L., Lu, L., Xia, L., Wang, G.-X., 2014. Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 428–429, 141–149. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.03.016

Henry, R.P., Lucu, ??edomil, Onken, H., Weihrauch, D., 2012. Multiple functions of the crustacean gill: Osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. Front. Physiol. 3 NOV, 1–33. doi:10.3389/fphys.2012.00431

Hjelm, M., Bergh, O., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorsen, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H., Gram, L., 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae *Scophthalmus maximus* rearing units. Syst. Appl. Microbiol. 27, 360–371. doi:10.1078/0723-2020-00256

Holmblad, T., Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. Aquaculture 172, 111–123. doi:10.1016/S0044-8486(98)00446-3

Holmström, C., Kjelleberg, S., 1999. Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microb. Ecol. 30, 285–293. doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00656.x

Holmström, C., Mccloy, S., 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS Microbiol. Ecol. 41.

Hong, X.P., Xu, D., Zhuo, Y., Liu, H.Q., Lu, L.Q., 2016. Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone). J. Fish Dis. 39, 1085–1097. doi:10.1111/jfd.12441

Hume, M.E., 2011. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. Poult. Sci. 90, 2663–9. doi:10.3382/ps.2010-01030

IFREMER, 2016. PROJET DEDUCTION[2].

Imlay, J., Linn, S., 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science (80-.). 240, 1302–1309. doi:10.1126/science.3287616

Inada, M., Sudhakaran, R., Kihara, K., Nishi, J., Yoshimine, M., Mekata, T., Kono, T., Sakai, M., Yoshida, T., Itami, T., 2012. Molecular cloning and characterization of the NADPH oxidase from the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*: early gene up-regulation after *Vibrio penaeicida* and poly(I:C) stimulations in vitro. Mol. Cell. Probes 26, 29–41. doi:10.1016/j.mcp.2011.11.002

Isnansetyo, A., Kamei, Y., 2003. MC21-A , a Bactericidal Antibiotic Produced by a New Marine

against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Society 170, 481–490. doi:10.1128/AAC.47.2.480

Ivanova, E.P., 2002. *Pseudoalteromonas translucida* sp. nov. and *Pseudoalteromonas paragorgicola* sp. nov., and emended description of the genus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1759–1766. doi:10.1099/ijs.0.02097-0

Ivanova, E.P., Flavier, S., Christen, R., 2004. Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: Emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., Ferri. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1773–1788. doi:10.1099/ijs.0.02997-0

Ivanova, E.P., Sawabe, T., Lysenko, A.M., Gorshkova, N.M., Svetashev, V.I., Nicolau, D. V, Yumoto, N., Taguchi, T., Yoshikawa, S., Christen, R., Mikhailov, V. V, 2002. *Pseudoalteromonas ruthenica* sp. nov., isolated from marine invertebrates. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 235–240.

Ji, P.-F., Yao, C.-L., Wang, Z.-Y., 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. Fish Shellfish Immunol. 27, 563–70. doi:10.1016/j.fsi.2009.08.001

Ji, P.F., Yao, C.L., Wang, Z.Y., 2011. Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against Vibrio parahaemolyticus and WSSV infection. Dis. Aquat. Organ. 96, 9–20. doi:10.3354/dao02373

Jin, G., Wang, S., Yu, M., Yan, S., Zhang, X.H., 2010. Identification of a marine antagonistic strain JG1 and establishment of a polymerase chain reaction detection technique based on the gyrB gene. Aquac. Res. 41, 1867–1874. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02591.x

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology 211, 213–236. doi:10.1016/j.imbio.2005.10.015

Jollès, P., Jollès, J., 1984. What's new in lysozyme research? - Always a model system, today as yesterday. Mol. Cell. Biochem. 63, 165–189. doi:10.1007/BF00285225

Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Kimura, T., 1988. Screening of Bacteria with Antiviral Activity from Fresh Water Salmonid Hatcheries. Microbiol. Immunol. 32, 67–73. doi:10.1111/j.1348-0421.1988.tb01366.x

Kang, S.W., Rhee, S.G., Chang, T.S., Jeong, W., Choi, M.H., 2005. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: Therapeutic implications. Trends Mol. Med. 11, 571–578. doi:10.1016/j.molmed.2005.10.006

Karunasagar, I., Ababouch, L., 2012. Shrimp viral diseases, import risk assessment and international trade. Indian J. Virol. 23, 141–148. doi:10.1007/s13337-012-0081-4

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019

Kim, M.S., Min, E.Y., Kim, J.H., Koo, J.K., Kang, J.C., 2015. Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc culture system using probiotics. Fish Shellfish Immunol. 47, 141–146. doi:10.1016/j.fsi.2015.08.027

Kongnum, K., Hongpattarakere, T., 2012. Effect of *Lactobacillus* plantarum isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish Shellfish Immunol. 32, 170–177.

doi:10.1016/j.fsi.2011.11.008
Kumar, V., Roy, S., Meena, D.K., Sarkar, U.K., 2016. Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. Rev. Fish. Sci. Aquac. 24, 342–368. doi:10.1080/23308249.2016.1193841
Labreuche, Y., Chenivesse, Sabine Alexandra, J., Le Panse, S., Boulo, V., Ansquer, D., Pagès, S., Givaudan, A., Czjzek, M., Le Roux, F., 2017. Nigritoxin, a novel bacterial toxin for crustaceans and insects (Tetraconata). Nat. Commun.
Lakshmi, B., Viswanath, B., Sai Gopal, D.V.R., 2013. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. J. Pathog. 2013, 424123. doi:10.1155/2013/424123
Le Moullac, G. Le, Groumellec, M. Le, Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish Shellfish Immunol. 7, 227–234. doi:10.1006/fsim.1996.0077
Le Roux, F., Labreuche, Y., Davis, B.M., Iqbal, N., Mangenot, S., Goarant, C., Mazel, D., Waldor, M.K., 2011. Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. Environ. Microbiol. 13, 296–306. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02329.x
Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, J.A., Chim, L., 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. Aquaculture 209, 307–317. doi:10.1016/S0044-8486(01)00756-6
Lemonnier, H., Herbland, A., Salery, L., Soulard, B., 2006. “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow out ponds in New Caledonia: Zootechnical and environmental factors. Aquaculture 261, 1039–1047. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.036
Lesser, M.P., 2006. OXIDATIVE STRESS IN MARINE ENVIRONMENTS: Biochemistry and Physiological Ecology. Annu. Rev. Physiol. 68, 253–278. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001
Levine, R., 2002. Serial Review : Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease. Free Radic. Biol. Med. 32, 797–803. doi:10.1016/S0891-5849(02)00780-3
Leyva-Madrigal, K.Y., Luna-González, A., Escobedo-Bonilla, C.M., Fierro-Coronado, J.A., Maldonado-Mendoza, I.E., 2011. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. Aquaculture 322–323, 16–22. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.09.033
Li, C.-C., Yeh, S.-T., Chen, J.-C., 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. Fish Shellfish Immunol. 25, 853–60. doi:10.1016/j.fsi.2008.09.014
Li, F., Xiang, J., 2013a. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. Dev. Comp. Immunol. 39, 11–26. doi:10.1016/j.dci.2012.03.016
Li, F., Xiang, J., 2013b. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. Fish Shellfish Immunol. 34, 973–80. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.023
Li, J., Tan, B., Mai, K., 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture 291, 35–40. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.03.005
Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191, 209–245. doi:10.1016/S0044-8486(00)00429-4

Lin, Y.-C., Vaseeharan, B., Chen, J.-C., 2008. Molecular cloning and phylogenetic analysis on alpha2-macroglobulin (alpha2-M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. 32, 317–29. doi:10.1016/j.dci.2007.07.002

Lin, Y.C., Chen, J.C., Chen, Y.Y., Yeh, S.T., Chen, L.L., Huang, C.L., Hsieh, J.F., Li, C.C., 2015. Crowding of white shrimp *Litopenaeus vananmei* depresses their immunity to and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol. 45, 104–111. doi:10.1016/j.fsi.2015.02.012

Liu, C.-H., Tseng, M.-C., Cheng, W., 2007. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. Fish Shellfish Immunol. 23, 34–45. doi:10.1016/j.fsi.2006.09.002

Liu, F., Li, F., Dong, B., Wang, X., Xiang, J., 2009. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition protein, lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein (LGBP) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Mol. Biol. Rep. 36, 471–477. doi:10.1007/s11033-007-9203-2

Liu, F., Liu, Y., Li, F., Dong, B., Xiang, J., 2005. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Mar. Biotechnol. 7, 600–608. doi:10.1007/s10126-005-5006-4

Liu, K.-F., Chiu, C.-H., Shiu, Y.-L., Cheng, W., Liu, C.-H., 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish Shellfish Immunol. 28, 837–44. doi:10.1016/j.fsi.2010.01.012

Liu, K.F., Yeh, M.S., Kou, G.H., Cheng, W., Lo, C.F., 2010. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. Dev. Comp. Immunol. 34, 935–944. doi:10.1016/j.dci.2010.04.001

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Loh, J.Y., Ting, A.S.Y., 2016. Effects of potential probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on digestive enzymatic activities of live feed *Artemia franciscana*. Aquac. Int. 24, 1–11. doi:10.1007/s10499-016-9991-2

Longeon, A., Copp, B.R., Quévrain, E., Roué, M., Kientz, B., Cresteil, T., Petek, S., Debitus, C., Bourguet-Kondracki, M.L., 2011. Bioactive indole derivatives from the South Pacific marine sponges *Rhopaloeides odorabile* and *Hyrtios* sp. Mar. Drugs 9, 879–888. doi:10.3390/md9050879

Longeon, A., Copp, B.R., Roué, M., Dubois, J., Valentin, A., Petek, S., Debitus, C., Bourguet-Kondracki, M.L., 2010. New bioactive halenaquinone derivatives from South Pacific marine sponges of the genus *Xestospongia*. Bioorganic Med. Chem. 18, 6006–6011. doi:10.1016/j.bmc.2010.06.066

Longeon, A., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Corre, S., Nicolas, J.-L.L., Guyot, M., 2005. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. Mar. Biotechnol. (NY). 6, 633–41. doi:10.1007/s10126-004-3009-1

Lorenzon, S., De Guarrini, S., Smith, V.J., Ferrero, E.A., 1999. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. Fish Shellfish Immunol. 9, 31–50. doi:10.1006/fsim.1998.0168

Lu, S.C., 2014. Glutathione Synthesis. Biochim Biophys Acta 1830, 3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.GLUTATHIONE

Luis-Villaseñor, I.E., Macías-Rodríguez, M.E., Gómez-Gil, B., Ascencio-Valle, F., Campa-Córdova, Á.I., 2011. Beneficial effects of four Bacillus strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 321, 136–144. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.08.036

Lukasheva, E. V., Berezov, T.T., 2002. L-lysine-oxidase: Physicochemical and biological properties. Biochem. 67, 1152–1158. doi:10.1023/A:1020967408229

Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M., Hirayama, K., 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. Hydrobiologia 358, 285–290. doi:10.1023/A:1003126129709

Maeda, M., Shibata, A., Biswas, G., Korenaga, H., Kono, T., Itami, T., Sakai, M., 2013. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) Intestine and Assessment of Immunomodulatory Role of a Selected Strain as Probiotic. Mar. Biotechnol. 16, 181–192. doi:10.1007/s10126-013-9532-1

Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J.S., 2004. Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3232–3238. doi:10.1128/AEM.70.6.3232

Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J.S., Sanchez-Amat, A., Kjelleberg, S., 2008. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 190, 5493–5501. doi:10.1128/JB.00549-08

Mai, W., Hu, C., 2009. cDNA cloning, expression and antibacterial activity of lysozyme C in the blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). Prog. Nat. Sci. 19, 837–844. doi:10.1016/j.pnsc.2008.10.008

Mai, W., Wang, W., 2010. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. Fish Shellfish Immunol. 28, 727–33. doi:10.1016/j.fsi.2010.01.002

Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. Eur. J. Biochem. 47, 469–474. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x

Martin, G., Graves, B., 1985. Fine Structure and Classification of Shrimp Hemocytes. J. Morphol. 339–348.

Mathew, S., Kumar, K.A., Anandan, R., Viswanathan Nair, P.G., Devadasan, K., 2007. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 145, 315–320. doi:10.1016/j.cbpc.2007.01.001

Matias, H.B., Yusoff, F.M., Shariff, M., Azhar, O., 2002. Effects of Commercial Microbial Products on Water Quality in Tropical Shrimp Culture Ponds. Asian Fish. Sci. 15, 239–248.

McIntosh, D., Samocha, T.M., Jones, E.R., Lawrence, A.L., McKee, D.A., Horowitz, S., Horowitz, A., 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. Aquac. Eng. 21, 215–227. doi:10.1016/S0144-8609(99)00030-8

Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., 2013. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). Fish Physiol. Biochem. 39, 431–457. doi:10.1007/s10695-012-9710-5

Mermoud, I., Costa, R., Ferré, O., Goarant, C., Haffner, P., 1998. “Syndrome 93” in New

Caledonian outdoor rearing ponds of Penaeus stylirostris: History and description of three major outbreaks. Aquaculture 164, 323–335. doi:10.1016/S0044-8486(98)00197-5

Middlemiss, K.L., Daniels, C.L., Urbina, M.A., Wilson, R.W., 2015. Combined effects of UV irradiation, ozonation, and the probiotic *Bacillus* spp. on growth, survival, and general fitness in European lobster (*Homarus gammarus*). Aquaculture 444, 99–107. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.03.028

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G., Mohanta, K.N., 2013. Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 97, 405–430. doi:10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x

Moriarty, D., 1999. Control of luminous *Vibrio* species in panaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164, 351–358.

Moriarty, D.J.W., 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. Proc. 8th Int. Symp. Microb. Ecol. - Microb. Interact. Aquac. Dis. 2013, 424123. doi:10.1155/2013/424123

Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van Der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 191, 89–107. doi:10.1016/S0044-8486(00)00420-8

Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D., Bachère, E., 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic *vibrio*. Cell. Mol. Life Sci. 61, 961–972. doi:10.1007/s00018-003-3441-9

Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., Bachère, E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. Eur. J. Biochem. 269, 2678–2689. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x

Murphy, A.C., Fukuda, D., Song, Z., Hothersall, J., Cox, R.J., Willis, C.L., Thomas, C.M., Simpson, T.J., 2011. Engineered thiomarinol antibiotics active against MRSA are generated by mutagenesis and mutasynthesis of pseudoalteromonas SANK73390. Angew. Chemie - Int. Ed. 50, 3271–3274. doi:10.1002/anie.201007029

Murray, G.E., Robin, R.S., Junkins, B., Kushner, D.J., 1984. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 48, 73–77.

Nayak, S., Singh, S.K., Ramaiah, N., Sreepada, R.A., 2010. Identification of upregulated immune-related genes in *Vibrio harveyi* challenged *Penaeus monodon* postlarvae. Fish Shellfish Immunol. 29, 544–549. doi:10.1016/j.fsi.2010.05.010

Nogami, K., Maeda, M., 1992. Bacteria as Biocontrol Agents for Rearing Larvae of the Crab *Portunus trituberculatus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 2373–2376. doi:10.1139/f92-261

Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. Free Radic. Biol. Med. 31, 1287–1312. doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9

Offret, C., Desriac, F., Le Chevalier, P., Mounier, J., J??gou, C., Fleury, Y., 2016. Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and ecological significance. Mar. Drugs 14. doi:10.3390/md14070129

Okumura, T., 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 22, 68–76.

doi:10.1016/j.fsi.2006.03.013
Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J., Contreras, R., 2011. Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and Bacillus probiotic strains. Mar. Drugs 9, 1119–1132. doi:10.3390/md9061119
Papagianni, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. Biotechnol. Adv. 21, 465–499. doi:10.1016/S0734-9750(03)00077-6
Parrilla-Taylor, D.P., Zenteno-Savín, T., Magallón-Barajas, F.J., 2013. Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. Aquaculture 380–383, 41–46. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.11.031
Péqueux, A., 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. J. Crustac. Biol. 15, 1–60.
Pham, D., 2011. Recherche et caractérisation de souches bactériennes à activité probiotique pour les élevages larvaires de crevettes *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie Rapport de stage Master 1 Ingénierie Nutraceutique 2010-2011. Aquaculture 209, 1–38. doi:10.1016/S0044-8486(01)00756-6
Pham, D., Ansquer, D., Chevalier, A., Dauga, C.C., Peyramale, A., Wabete, N., Labreuche, Y., 2014. Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. Aquaculture 432, 475–482. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.031
Pham, D., Charmantier, G., Boulo, V., Wabete, N., Ansquer, D., Dauga, C., Grousset, E., Labreuche, Y., Charmantier-Daures, M., 2016. Ontogeny of osmoregulation in the Pacific blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (*Decapoda*, *Penaeidae*): Deciphering the role of the Na+/K+-ATPase. Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol. 196–197, 27–37. doi:10.1016/j.cbpb.2015.12.007
Pham, D., Charmantier, G., Wabete, N., Boulo, V., Broutoi, F., Mailliez, J.R., Peignon, J.M., Charmantier-Daures, M., 2012. Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (*Decapoda*, *Penaeidae*). Aquaculture 362–363, 10–17. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.026
Pickens, L.B., Tang, Y., 2009. Decoding and engineering tetracycline biosynthesis. Metab. Eng. 11, 69–75. doi:10.1016/j.ymben.2008.10.001
Pujalte, M.J., Sitjà-Bobadilla, A., Macián, M.C., Álvarez-Pellitero, P., Garay, E., 2007. Occurrence and virulence of *Pseudoalteromonas* spp. in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Molecular and phenotypic characterisation of P. undina strain U58. Aquaculture 271, 47–53. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.06.015
Rameshthangam, P., Ramasamy, P., 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture 254, 32–39. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.10.011
Ramírez, C.N.B., Rodrigues, M.S., Guimarães, A.M., Guertler, C., Rosa, J.R., Seiffert, W.Q., Andreatta, E.R., Vieira, F. do N., 2017. Effect of dietary supplementation with butyrate and probiotic on the survival of Pacific white shrimp after challenge with *Vibrio alginolyticus*. Rev. Bras. Zootec.
Rao, D., Webb, J.S., Kjelleberg, S., 2005. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Appl. Environ. Microbiol.

71, 1729–1736. doi:10.1128/AEM.71.4.1729-1736.2005
Rasmussen, T., Jensen, J., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P.H., 1993. Structure and synthesis of bromoindoles from the marine sponge *Pseudosuberites hyalinus*. J. Nat. Prod. 56, 1553–1558. doi:10.1021/np50099a014
Ren, Q., Sun, R.R., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2009a. A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 149, 613–623. doi:10.1016/j.cbpc.2009.01.007
Ren, Q., Xu, Z.L., Wang, X.W., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2009b. Clip domain serine protease and its homolog respond to Vibrio challenge in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol. 26, 787–798. doi:10.1016/j.fsi.2009.03.004
Ren, X., Pan, L., Wang, L., 2014. Effect of florfenicol on selected parameters of immune and antioxidant systems, and damage indexes of juvenile *Litopenaeus vannamei* following oral administration. Aquaculture 432, 106–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.024
Rengpipat, S., Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture 191, 271–288.
Ridley, C.P., Lee, H.Y., Khosla, C., 2008. Evolution of polyketide synthases in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 4595–600. doi:10.1073/pnas.0710107105
Rodriguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., Bachere, E., 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J. Cell Sci. 108 (Pt 3, 1043–1050.
Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., Stern, S., 2007. Exposure to probiotics and β-1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. Aquaculture 273, 405–415. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.10.042
Rodriguez, J., Le Moullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191, 109–119.
Rolland, J.L., Abdelouahab, M., Dupont, J., Lefevre, F., Bachère, E., Romestand, B., 2010. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Mol. Immunol. 47, 1269–1277. doi:10.1016/j.molimm.2009.12.007
Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R., Dhar, A.K., 2002. The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). J. Virol. 76, 7140–9. doi:10.1128/JVI.76.14.7140
Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K., 1999. Probiotics: How should they be defined? Trends Food Sci. Technol. 10, 107–110. doi:10.1016/S0924-2244(99)00027-8
Sandaa, R.-A., Brunvold, L., Magnesen, T., Bergh, Ø., 2008. Monitoring the opportunistic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. LT-13 in a great scallop, *Pecten maximus* hatchery. Aquaculture 276, 14–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.02.007
Saulnier, D., Labreuche, Y., Haffner, P., Ansquer, D., Levy, P., Nicolas, J.-L., 2000. Searching of probiotic candidates fro shrimp industry, antimicrobial activities of *Pseudoalteromonas piscicida* strains against shrimp pathogens, in: World Aquaculture Society (Ed.), Responsible Aquaculture in the New Millenium. European aquaculture society, p. 636.
Scholz, U., Garcia Diaz, G., Ricque, D., Cruz Suarez, L.E., Vargas Albores, F., Latchford, J., 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture 176, 271–283. doi:10.1016/S0044-8486(99)00030-7

Sherratt, P.J., Hayes, J.D., 2002. Glutathione S-transferases, in: Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 319–352. doi:10.1002/0470846305.ch9

Sivagnanavelmurugan, M., Thaddaeus, B.J., Palavesam, A., Immanuel, G., 2014. Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 39, 439–449. doi:10.1016/j.fsi.2014.05.037

Solanki, H.K., Pawar, D.D., Shah, D.A., Prajapati, V.D., Jani, G.K., Mulla, A.M., Thakar, P.M., 2013. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. Biomed Res. Int. 2013. doi:10.1155/2013/620719

Song, Y., Li, Z., Lin, H., Du, S., Hao, Z., Lin, H., Zhu, Z., 2015. Effect of malondialdehyde treatment on the IgE binding capacity and conformational structure of shrimp tropomyosin. Food Chem. 175, 374–380. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.001

Stiles, B.G., Sexton, F.W., Weinstein, S.A., 1991. Antibacterial effects of different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. Toxicon 29, 1129–1141. doi:10.1016/0041-0101(91)90210-I

Strieker, M., Tanović, A., Marahiel, M.A., 2010. Nonribosomal peptide synthetases: Structures and dynamics. Curr. Opin. Struct. Biol. 20, 234–240. doi:10.1016/j.sbi.2010.01.009

Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., Deguchi, Y., 1997. Vibrio sp. strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4986–4989.

Takahashi, Y., Shimoyama, Y., Momoyama, K., 1985. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Bull. Japanese Soc. Sci. Fish. 51, 721–730. doi:10.2331/suisan.51.721

Talpur, A.D., Memon, A.J., Khan, M.I., Ikhwanuddin, M., Daniel, M.M.D., Munafi, A.A., 2011. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of pathogenic flora associated with the gut of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1857). J. Anim. Vet. Adv. doi:10.3923/javaa.2011.2106.2119

Tan, L.T.H., Chan, K.G., Lee, L.H., Goh, B.H., 2016. *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture. Front. Microbiol. 7, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2016.00079

Tassanakajon, A., 2013. Innate immune system of shrimp. Fish Shellfish Immunol. 34, 953. doi:10.1016/j.fsi.2012.09.024

Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., Tang, S., 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. Fish Shellfish Immunol. 34, 954–67. doi:10.1016/j.fsi.2012.09.021

Tendencia, E.A., De La Peña, L.D., 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 195, 193–204. doi:10.1016/S0044-8486(00)00570-6

Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W., Itsathitphaisarn, O., 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. Aquaculture 452, 69–87. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.028

Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Afonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J.-C., Rebuffat, S., 2004. Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. J. Biol. Chem. 279, 28233–42. doi:10.1074/jbc.M400228200

Tinh, N.T.N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2007. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. Mar. Biotechnol. 10, 1–12. doi:10.1007/s10126-

007-9054-9
Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., Liu, C.H., 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish Shellfish Immunol. 26, 339–344. doi:10.1016/j.fsi.2008.12.003
van de Braak, C.B.T., Botterblom, M.H. a., Taverne, N., van Muiswinkel, W.B., Rombout, J.H.W.M., van der Knaap, W.P.W., 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. Fish Shellfish Immunol. 13, 293–309. doi:10.1006/fsim.2002.0409
Vargas-Albores, F., Porchas-Cornejo, M.A., Martínez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L.R., 2017. Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. Helgol. Mar. Res. 71, 5. doi:10.1186/s10152-017-0485-z
Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K., 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquac. Res. 35, 501–507. doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01045.x
Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 655–71. doi:10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000.Updated
Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol. Rev. 30, 404–427. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x
Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., Massabuau, J.C., 2008. Life on the edge: Physiological problems in penaeid prawns *Litopenaeus stylirostris*, living on the low side of their thermopreferendum. Mar. Biol. 154, 403–412. doi:10.1007/s00227-008-0931-1
Wang, D., Li, F., Chi, Y., Xiang, J., 2012. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. Cell Stress Chaperones 17, 423–33. doi:10.1007/s12192-011-0317-z
Wang, P.-H., Wan, D.-H., Pang, L.-R., Gu, Z.-H., Qiu, W., Weng, S.-P., Yu, X.-Q., He, J.-G., 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily gene, TNF receptor superfamily gene and lipopolysaccharide-induced TNF-α factor (LITAF) gene from *Litopenaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. 36, 39–50. doi:10.1016/j.dci.2011.06.002
Wang, X.-W.W., Wang, J.-X.X., 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. Fish Shellfish Immunol. 34, 981–989. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.008
Wang, X.W., Xu, J.D., Zhao, X.F., Vasta, G.R., Wang, J.X., 2014. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. J. Biol. Chem. 289, 11779–11790. doi:10.1074/jbc.M114.552307
Wang, Y.-C., Chang, P.-S., Chen, H.-Y., 2008. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of beta-1,3-glucan. Fish Shellfish Immunol. 24, 113–21. doi:10.1016/j.fsi.2007.09.008
Wang, Y.-C., Chang, P.-S., Chen, H.-Y., 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 23, 1161–77. doi:10.1016/j.fsi.2007.04.004
Wang, Y.B., Xu, Z.R., Xia, M.S., 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. Fish. Sci. 71, 1036–1041. doi:10.1111/j.1444-

2906.2005.01061.x
Wen, C., Xue, M., Liang, H., Zhou, S., 2014. Evaluating the potential of marine *Bacteriovorax* sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae. Vet. Microbiol. 173, 84–91. doi:10.1016/j.vetmic.2014.07.022
Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137–161. doi:10.1016/0166-445X(91)90033-6
Xia, Z., Zhu, M., Zhang, Y., 2014. Effects of the probiotic *Arthrobacter* sp. CW9 on the survival and immune status of white shrimp (*Penaeus vannamei*). Lett. Appl. Microbiol. 58, 60–4. doi:10.1111/lam.12156
Xian, J.-A., Guo, H., Li, B., Miao, Y.-T., Ye, J.-M., Zhang, S.-P., Pan, X.-B., Ye, C.-X., Wang, A.-L., Hao, X.-M., 2013. Measurement of intracellular nitric oxide (NO) production in shrimp haemocytes by flow cytometry. Fish Shellfish Immunol. 35, 2032–9. doi:10.1016/j.fsi.2013.10.014
Yang, C., Zhang, J., Li, F., Ma, H., Zhang, Q., Jose Priya, T. a, Zhang, X., Xiang, J., 2008. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. Fish Shellfish Immunol. 24, 564–74. doi:10.1016/j.fsi.2007.12.012
Yang, L.-S., Yin, Z.-X., Liao, J.-X., Huang, X.-D., Guo, C.-J., Weng, S.-P., Chan, S.-M., Yu, X.-Q., He, J.-G., 2007. A Toll receptor in shrimp. Mol. Immunol. 44, 1999–2008. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.021
Yang, L.H., Xiong, H., Lee, O.O., Qi, S.H., Qian, P.Y., 2007. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. Lett. Appl. Microbiol. 44, 625–630. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02125.x
Yeh, M.-S., Tsai, W.-L., Cheng, W., 2013. Identification and cloning of the second type transglutaminase from *Litopenaeus vannamei*, and its transcription following pathogen infection and in relation to the haemolymph coagulation. Fish Shellfish Immunol. 35, 1613–23. doi:10.1016/j.fsi.2013.09.002
Young Lee, S., Söderhäll, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. Fish Shellfish Immunol. 12, 421–437. doi:10.1006/fsim.2002.0420
Yu, M., Tang, K., Shi, X., Zhang, X.-H., 2012a. Genome sequence of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1, a marine antagonistic bacterium with abundant antimicrobial metabolites. J. Bacteriol. 194, 3735. doi:10.1128/JB.00598-12
Yu, M., Wang, J., Tang, K., Shi, X., Wang, S., Zhu, W., Zhang, X., 2012b. Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. Microbiology 158, 835–42. doi:10.1099/mic.0.055970-0
Yudiati, E., Isnansetyo, A., Murwantoko, Ayuningtyas, Triyanto, Handayani, C.R., 2016. Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 54, 46–53. doi:10.1016/j.fsi.2016.03.022
Zhang, H., Wang, Y., Wu, J., Skalina, K., Pfeifer, B.A., 2010. Complete biosynthesis of erythromycin A and designed analogs using *E. coli* as a heterologous host. Chem. Biol. 17, 1232–1240. doi:10.1016/j.chembiol.2010.09.013
Zhang, Q., Li, F., Zhang, X., Dong, B., Zhang, J., Xie, Y., Xiang, J., 2008. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol. 24, 584–591. doi:10.1016/j.fsi.2008.01.008
Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., Wang, X., Liufu, Z., 2011. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide

influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). Aquac. Res. 42, 943–952. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02677.x

Zhang, Z.F., Shao, M., Ho Kang, K., 2006. Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol. 21, 159–69. doi:10.1016/j.fsi.2005.11.003

Zhao, H., Cao, J., Wang, A., Huang, Y., Li, G., Lan, H., 2013. Effect of Long-Term Administration of Dietary β -Glucan on the Expression of Immune-Related Genes in *Litopenaeus vannamei* Institute of Animal Science , Guangdong Academy of Agricultural. Isr. J. Aquac. - Bamidgeh 1–8.

Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., Zhang, X.H., 2016. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. Aquaculture 451, 163–169. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.09.020

Zhou, X., Wang, Y., Li, W., 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287, 349–353. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.046

Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Balcazar, J.L., 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 36, 68–74. doi:10.1016/j.fsi.2013.10.007

Zokaeifar, H., Balcazar, J.L., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Zokaeifar, H., Saad, C.R., 2012a. Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. J. Antibiot. (Tokyo). 65, 289–294. doi:10.1038/ja.2012.17

Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Nejat, N., 2012b. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 33, 683–9. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.027

Zorriehzahra, M.J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Lazado, C.C., 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. Vet. Q. 2176, 1–14. doi:10.1080/01652176.2016.1172132

Résumé / Summary

Résumé

La souche *Pseudoalteromonas sp*. NC201, isolée en Nouvelle-Calédonie, possède des propriétés antibactériennes et probiotiques dans le cadre d'élevages larvaires de crevettes. Ainsi, cette souche bactérienne constitue une alternative à l'utilisation des antibiotiques. Ce travail de thèse a été focalisé sur la caractérisation de NC201 et de son potentiel antimicrobien ainsi que sur l'étude de son effet sur la crevette, *Litopenaeus stylirostris* lors de challenges expérimentaux. L'analyse du génome complet de NC201 a révélé la présence de nombreux clusters de gènes codants des composés antimicrobiens ainsi que deux amino acides oxydases. Une de ces oxydases a été identifiée comme capable d'inhiber des *Vibrio* pathogènes de *L*. *stylirostris* tels que *V*. *penaeicida* et *V*. *nigripulchritudo*. Les essais *in vivo* ont permis de confirmer le rôle probiotique de NC201 vis-à-vis de *L*. *stylirostris*. En effet NC201 a été responsable d'une amélioration de la survie des animaux lors de stress hypo et hypersalins mais aussi lors de challenge biotique par infection avec *V*. *nigripulchritudo*. Le suivi dans l'hémolymphe de NC201 et *V. nigripulchritudo* a mis en évidence que ces deux bactéries étaient capables individuellement de coloniser l'hémolymphe des animaux, cependant, une exclusion mutuelle des deux bactéries a été observée dans ce compartiment pendant les 24 premières heures après l'infection. L'expression de gènes liés à la réponse immunitaire (*LGBP*, *SerProt*, *ProPO*, *SOD*, *Tgase*, *stylicine*, *ALF*, *Pen3*, Lys) ainsi qu'à la réponse au stress oxydant (*SOD*, *Cat*, *GPX*, *GST*) a été quantifiée suite au traitement probiotique et au challenge avec *V. nigripulchritudo,* dans les hémocytes et dans l'hépatopancréas, respectivement. La quantification et l'activité enzymatique de biomarqueurs du stress oxydant (GSSG/GSHT, SOD, CAT, GPX, Carb, MDA) ont été mesurées dans l'hépatopancréas. Les modulations de ces biomarqueurs ont révélé que la souche NC201 conférait aux crevettes un état de santé général amélioré, plus performant pour répondre à des stress.

Summary

The *Pseudoalteromonas* sp. NC201 strain, isolated in New Caledonia, displayed antibacterial and probiotic properties in shrimp hatcheries. This strain is an alternative to antibiotics use. This thesis focused on the characterization of NC201, its antimicrobial potential as well as on the study on its effect on *Litopenaeus stylirostris* during experimental challenges. The analysis of the complete genome sequence of NC201 revealed multiple clusters coding for potential antimicrobial compounds as well as two amino acid oxidases. One of these oxidases was identified as capable of inhibiting *Vibrio* pathogenic to *L. stylirostris* such as *V*. *penaeicida* and *V*. *nigripulchritudo*. *In vivo* trials confirmed the probiotic role of NC201 towards *L*. *stylirostris*. Indeed NC201 was responsible for higher survival rates in animals confronted to hypo and hypersaline stress as well as to bacterial challenge through infection with *V*. *nigripulchritudo*. During experimental infections the presence of NC201 and *V*. *nigripulchritudo* was monitored in the shrimp hemolymph. Both bacteria are capable of invading the shrimp's hemolymph but seemed mutually exclusive in this compartment during the 24 hours following the infection. The expression profile of genes involved in the immune response (*LGBP*, *SerProt, ProPO*, *SOD*, *Tgase*, *stylicin*, *ALF*, *Pen3*, *Lys*) and the response to oxidative stress (*SOD*, *Cat*, *GPX*, *GST*) were quantified in the hemolymph and hepatopancreas, respectively. Enzymatic activities and quantification of bioindicators of oxydative stress (GSSG/GSHT, SOD, CAT, GPX, Carb, MDA) were measured in the hepatopancreas. These modulations highlighted that NC201 induced an increase in the shrimp overall health status leading to enhanced responses to stresses.