

Mémoire

Auteur : Castiaux, Mabel

Promoteur(s) : 12746; Lepoint, Gilles

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en océanographie, à finalité approfondie

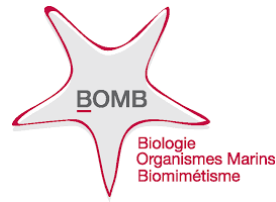
Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/21002>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Faculté des Sciences

Laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme (UMONS)

**Réponse comportementale et physiologique de
juvéniles de l'holothurie tropicale *Holothuria scabra*,
Jaeger, 1833, à des stress thermique et
immunologique combinés**



Promoteur : Dr Jérôme Delroisse
Co-promoteur : Dr Gilles Lepoint
Encadrant : Noé Wambreuse

Mémoire réalisé par
Mabel Castiaux

en vue de l'obtention du grade de Master en Océanographie à l'ULiège

2023-2024

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux personnes et institutions qui m'ont soutenue tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, je remercie chaleureusement les Professeurs Igor Eeckhaut et Patrick Flammang pour leur accueil au sein du Laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme (BOMB).

Un immense merci au Docteur Jérôme Delroisse, mon promoteur, pour son soutien indéfectible, ses corrections précieuses et son encouragement constant, particulièrement lors des moments de doute.

Je tiens également à remercier le Docteur Gilles Lepoint, mon co-promoteur, pour ses conseils avisés, que ce soit à Madagascar ou en Belgique, ainsi que pour le temps qu'il a consacré à des corrections toujours très instructives.

Au doctorant Noé Wambreuse, mon encadrant, je suis reconnaissante pour la mission exceptionnelle à Madagascar, les conseils précieux et les souvenirs inoubliables. Merci pour ta compréhension et ton soutien infaillible.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance au Docteur Guillaume Caulier qui, bien que n'étant pas mon promoteur officiel, m'a énormément apporté, que ce soit à Madagascar ou en Belgique, avec des paroles toujours bienveillantes et encourageantes.

J'aimerais remercier chaleureusement tous les membres du BOMB pour leur accueil exceptionnel. Leur bienveillance et leur soutien ont grandement facilité mon intégration et j'espère avoir l'occasion de travailler à nouveau avec eux à l'avenir.

Je voudrais adresser un grand merci aux membres du laboratoire de métabonomique : les Docteurs Vanessa Tagliatti, Raphaël Conotte et toute l'équipe du laboratoire pour leur aide précieuse dans ma formation aux différents outils de métabonomique.

Merci à tous les membres de l'Institut Halieutique des Sciences Marines à Tuléar pour leur accueil et leur assistance.

Je tiens également à remercier l'ARES pour l'octroi de la bourse qui m'a permis de partir à Madagascar et de réaliser ma première mission scientifique.

Un grand merci à mes proches pour m'avoir écouté parler en long, en large et en travers de mes concombres de mer.

RÉSUMÉ

Les écosystèmes tropicaux marins sont gravement affectés par le réchauffement climatique. Parmi ces écosystèmes, les holothuries, notamment *Holothuria scabra*, jouent un rôle écologique clé en tant que bioturbateurs et sont également économiquement importantes, particulièrement sur les marchés asiatiques. Ces organismes poïkilothermes (dont les fonctions métaboliques dépendent fortement de la température ambiante) sont vulnérables aux variations de température, ce qui pose des défis pour l'aquaculture, notamment à Madagascar.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'effet combiné d'un stress thermique et d'une injection d'eau de mer non-stérile (immunostimulation) sur le comportement et la physiologie de juvéniles d'*H. scabra*.

Une expérience a été menée sur 66 juvéniles d'*H. scabra*, répartis en trois conditions de température : froide (22°C), contrôle (27°C), chaude (33°C) avec et sans immunostimulation. Diverses variables ont été monitorées durant l'expérience : les variations en masse des individus, l'émergence potentielle de la SKin Ulceration Disease (SKUD) (une maladie marine souvent observée chez cet organisme aquacultivé), la mobilité des individus et la présence de métabolites spécifiques au sein du tissu musculaire (utilisée comme un proxy de variations métaboliques).

L'étude a révélé que les températures basses et hautes, respectivement de 22°C et 33°C, favorisent l'émergence de la SKUD. À 22°C, les manifestations sont continues, tandis qu'à 33°C, la maladie est apparue principalement en début d'expérience. Sur le plan comportemental, les conditions chaudes entraînent une augmentation de la mobilité, alors que les températures froides la réduisent. Les analyses métabonomiques réalisées en spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) révèlent des perturbations significatives, notamment une augmentation des acides aminés tels que le glutamate et l'alanine en conditions chaudes, ainsi que des variations des niveaux d'ADP, de fumarate, de malonate, de choline et de lactate, suggérant des déséquilibres métaboliques liés aux stress thermique et immunologique.

Les résultats suggèrent que le stress thermique, qu'il soit chaud ou froid, perturbe significativement la physiologie et le comportement de l'espèce modèle mais affaiblit également son système immunitaire, rendant les juvéniles plus vulnérables aux infections. Cependant, une forme d'acclimatation semblerait s'établir à 33°C, suggérant que les juvéniles d'*H. scabra* peuvent adapter leur métabolisme à cette température.

RÉSUMÉ VERSION ANGLAISE - SUMMARY

Marine ecosystems and species are severely affected by global warming, particularly tropical marine ecosystems. Among these ecosystems, sea cucumbers, particularly *Holothuria scabra*, play a key ecological role as bioturbators and are also economically important, particularly in Asian markets. These poikilothermic organisms, whose metabolic functions are highly dependent on ambient temperature, are vulnerable to temperature variations, which poses challenges for aquaculture, notably in Madagascar.

The main objective of this study was to evaluate the combined effect of thermal stress with an injection of non-sterile seawater (immunostimulation) on the behavior and physiology of *H. scabra* juveniles.

An experiment was carried out on 66 *H. scabra* juveniles, divided into three temperature conditions: cold (22°C), control (27°C) and warm (33°C), with and without immunostimulation. Various variables were monitored during the experiment: variations in the mass of the individuals, the potential emergence of SKin Ulceration Disease (SKUD, a marine disease often observed in this aquacultured organism), the mobility of the individuals tested, and the presence of specific metabolites within the muscle tissue (used as a proxy for metabolic variations).

The study revealed that low and high temperatures of 22°C and 33°C, respectively, favour the emergence of SKUD. At 22°C, manifestations were continuous, while at 33°C, the disease appeared mainly at the beginning of the experiment. Behaviorally, warm conditions increased mobility, while cold temperatures reduced it. Metabonomic analyses using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy revealed significant disturbances, including an increase in amino acids such as glutamate and alanine under warm conditions, as well as variations in ADP, fumarate, malonate, choline and lactate levels, suggesting metabolic imbalances linked to thermal and immunological stress.

The results suggest that heat stress, whether hot or cold, significantly disrupts the physiology and behaviors of the model species, but also weakens its immune system, making juveniles more vulnerable to infection. However, a form of acclimatization seems to develop at 33°C, suggesting that *H. scabra* juveniles can adapt their metabolism to this temperature.

TABLE DES MATIERES

PRÉAMBULE	7
INTRODUCTION	8
1. IMPORTANCE DE LA TEMPÉRATURE DANS LES ÉCOSYSTÈMES MARINS.....	8
1.1. <i>Réchauffement climatique</i>	8
1.2. <i>Effets de la température sur les échinodermes</i>	8
2. LES HOLOTHURIES : IMPORTANCE ÉCOLOGIQUE ET ÉCONOMIQUE	12
2.1. <i>Contribution des holothuries à l'écosystème marin</i>	12
2.2. <i>Importance économique des holothuries et aquaculture</i>	12
3. BIOLOGIE DE L'HOLOTHURIE <i>HOLOTHURIA SCABRA</i>	13
3.1. <i>Distribution et habitat</i>	13
3.2. <i>Morphologie générale</i>	14
3.3. <i>Systèmes</i>	15
3.4. <i>Reproduction, cycle de développement et croissance</i>	16
4. EFFETS DES VARIATIONS DE TEMPÉRATURE SUR <i>HOLOTHURIA SCABRA</i>	17
4.1. <i>Comportement</i>	17
4.2. <i>Effets physiologiques et métaboliques</i>	17
4.3. <i>Réponse immunitaire</i>	19
4.4. <i>Maladie SKin Ulceration Disease (SKUD)</i>	19
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE	22
MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
1. MADAGASCAR INSTITUT HALIEUTIQUE DES SCIENCES MARINES (IHSM)	23
1.1. <i>Design expérimental</i>	23
1.2. <i>Acclimatation</i>	24
1.3. <i>Mise en bassines</i>	24
1.4. <i>Caméras</i>	26
1.5. <i>Pesée et suivi de développement de la SKUD</i>	26
1.6. <i>Injections</i>	26
1.7. <i>Dissections</i>	26
2. PLAN D'ANALYSE DES RÉSULTATS ET TISSUS FIXÉS.....	28

2.1. <i>Pesées</i>	28
2.2. <i>Suivi de l'apparition de la SKUD</i>	29
2.3. <i>Tracking</i>	29
2.4. <i>Approche métabonomique</i>	30
RÉSULTATS	33
1.ÉVOLUTION DE LA MASSE	33
2.SUIVI DE L'APPARITION DE LA SKUD.....	33
3.TRACKING	35
4.APPROCHE MÉTABONOMIQUE.....	37
4.1. <i>Identification des métabolites</i>	37
4.2. <i>Profil métabolique par individu</i>	40
4.3. <i>Analyse en composantes principales</i>	41
4.4. <i>Analyses statistiques de chaque métabolite</i>	43
DISCUSSION	48
1.IMPACT DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'IMMUNOSTIMULATION SUR LA PERTE DE MASSE CHEZ <i>HOLOTHURIA SCABRA</i>	48
2.IMPACT DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'IMMUNOSTIMULATION SUR L'ÉMERGENCE DE LA SKUD CHEZ <i>HOLOTHURIA SCABRA</i>	48
3.IMPACT DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'IMMUNOSTIMULATION SUR LE COMPORTEMENT DE <i>HOLOTHURIA SCABRA</i>	50
4.IMPACT DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'IMMUNOSTIMULATION SUR LE MÉTABOLISME DE <i>HOLOTHURIA SCABRA</i>	52
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	55
ANNEXES	56
BIBLIOGRAPHIE	58

PRÉAMBULE

Les écosystèmes marins, vastes et diversifiés, sont soumis à des pressions environnementales croissantes, notamment en raison des changements climatiques globaux. Le réchauffement climatique, attribué principalement aux activités humaines telles que l'utilisation de combustibles fossiles, la déforestation et les pratiques agricoles intensives, entraîne des répercussions profondes sur les océans. L'augmentation de la température de l'eau affecte directement les habitats marins, modifiant les conditions de vie des espèces et perturbant les réseaux trophiques établis.

Les échinodermes, groupe incluant les étoiles de mer, les oursins, les crinoïdes, les ophiures et les concombres de mer, sont particulièrement sensibles aux variations de température en raison de leur nature poïkilotherme. Ces organismes dépendent fortement de la température de leur environnement pour réguler leurs fonctions métaboliques et physiologiques, et leurs comportements. Ainsi, les changements thermiques peuvent entraîner des réponses variées chez les échinodermes, affectant leur physiologie, leur immunité, leur comportement et, par conséquent, leur survie et leur reproduction.

Parmi les échinodermes, les holothuries, aussi appelées concombres de mer, jouent un rôle important dans les écosystèmes marins. En tant que bioturbateurs, elles contribuent au recyclage des nutriments et à l'aération des sédiments marins, facilitant ainsi le maintien de la « bonne santé » de l'écosystème. *Holothuria scabra*, une espèce d'holothurie largement étudiée pour son importance écologique et économique, est particulièrement vulnérable aux variations de température. Cette espèce, prisée sur les marchés asiatiques pour sa valeur commerciale, fait également l'objet de nombreuses initiatives d'aquaculture, notamment à Madagascar, visant à répondre à la demande asiatique tout en évitant la surpêche et en soutenant l'économie locale.

INTRODUCTION

1. Importance de la température dans les écosystèmes marins

1.1. Réchauffement climatique

Les changements climatiques, largement attribués aux activités humaines telles que l'utilisation massive des combustibles fossiles, la déforestation et les pratiques agricoles intensives, ont des répercussions profondes et multiples sur les océans et les écosystèmes marins (GIEC, 2022).

Le métabolisme des organismes augmente avec la hausse de la température jusqu'à atteindre leur limite thermique (Newell, 1966, Lang et al., 2023). Les organismes ectothermes, comme les plantes, les invertébrés et certains vertébrés, ne produisent pas de chaleur et leur température corporelle suit celle de leur environnement (Ohlberger, 2013). Bien que cela dépende de leur tolérance thermique, ils sont souvent particulièrement sensibles aux variations de température, qui influencent leur croissance, leur physiologie, leur comportement et leur répartition (Deutsch et al., 2010, Ohlberger, 2013, Barry et al., 1995, Lagerspetz et Vainio, 2006, Poloczanska et al., 2016). De plus, les espèces marines tropicales, celles qui vivent en surface ou dans les régions polaires, risquent d'être particulièrement touchées par l'augmentation de la température (Doney et al., 2012, Laurance et al., 2011, McQuaid et Branch, 1984).

1.2. Effets de la température sur les échinodermes

Les effets de la température sur les échinodermes sont multiples et variés, la température influence notamment leur physiologie et leur comportement. La température peut affecter significativement les comportements alimentaires et la croissance de certaines espèces d'échinodermes. Par exemple, une augmentation de la température favorise la croissance et le taux d'alimentation de l'étoile de mer prédatrice des régions tempérées, *Pisaster ochraceus* (Gooding et al., 2009). De façon similaire, l'holothurie tropicale *Stichopus monotuberculatus* montre une activité alimentaire et un mouvement nocturne plus intenses à la température maximale étudiée, soit 31°C (Chen, 2022). Pour l'oursin tempéré *Mesocentrotus nudus* vivant sur les fonds peu profonds de Chine, de Russie et du Japon, une température de 20°C, lui permet également une meilleure croissance qu'une température de 10°C bien que sa croissance soit idéale à 15°C (Agatsuma, 2020, Ding et al., 2020, Zhang et al., 2017). Par ailleurs, *Phataria unifascialis*, une étoile de mer du Mexique, voit son activité et ses taux métaboliques diminuer

à des températures plus basses, correspondant aux conditions hivernales de son habitat naturel, ce qui influence sa dispersion et sa répartition (Morgan et Cowles, 1997). En revanche, pour l'espèce tempérée de concombre de mer *Apostichopus japonicus*, l'activité alimentaire la plus élevée a été observée à 16°C, tandis qu'un comportement alimentaire réduit a été noté à 24°C (Sun et al., 2018).

Des effets significatifs de la température sont également observés sur la mortalité. Les populations d'ophiures *Ophiopholis schayeri* subissent une augmentation de la mortalité qui passe de 1,3% à 15% lorsque la température est augmentée de 3°C par rapport à la température du groupe contrôle sur une période de cinq semaines. Au-delà de cette température, les organismes ne survivent pas, indiquant une vulnérabilité accrue au réchauffement climatique car cette espèce vit proche de sa limite thermique supérieure (Christensen et al., 2011).

Le système immunitaire peut également être impacté par l'augmentation de la température (Brothers et al., 2016). Chez l'espèce d'oursin *Heliocidaris erythrogramma* et les deux espèces d'holothuries tempérées *Parastichopus regalis* et *Apostichopus japonicus*, la capacité phagocytaire des cellules immunitaires appelées cœlomocytes, mécanisme de défense important, est réduite lorsque la température augmente (Brothers et al., 2016, Galimany et al., 2018, Wang et al., 2008). Le nombre de cœlomocytes chute également chez *H. erythrogramma* et *P. regalis* (Brothers et al., 2016, Galimany et al., 2018). L'activité bactéricide des cœlomocytes de l'oursin et celle de l'holothurie *A. japonicus* diminue également avec des changements aigus de température (Brothers et al., 2016, Wang et al., 2008). Cet affaiblissement du système immunitaire rend les organismes plus vulnérables aux maladies infectieuses (Brothers et al., 2016).

La température peut également influencer le métabolisme. Pour étudier cet impact, une approche métabonomique, qui consiste en « l'étude systématique des empreintes chimiques uniques laissées par des processus cellulaires spécifiques », peut être employée (Wu et al., 2011, Bollard et al., 2005). Cette méthode, couplée à des techniques analytiques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie liquide-spectrométrie de masses (LC-MS) ou la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) permettent d'évaluer les variations physiologiques des organismes marins notamment (Popov et al., 2016, Shao et al., 2015). Dans l'étude de Popov et al. (2016), menée à l'aide d'une approche métabonomique avec des analyses LC-MS, l'impact de divers stress sur l'étoile de mer *Patiria pectinifera* a été examiné. Il a été observé qu'une augmentation de la température entraîne une diminution des concentrations d'astérosaponines, un composé stéroïdien généralement impliqué

dans les réponses de défense. De plus, les niveaux de polyhydroxystéroïdes et de glycosides augmentent. Ces composés sont associés à des fonctions digestives mais aussi à des propriétés neuroprotectrices, suggérant un rôle potentiellement protecteur ou réparateur en conditions de stress thermique (Popov et al., 2016).

Les comportements de protection contre le rayonnement solaire tels que la couverture, consistant à se recouvrir de morceaux de coquillages, ou la capacité à se déplacer pour se mettre à l'abri, sont également modifiés suite à des variations de température. Chez l'oursin *Strongylocentrotus intermedius*, une augmentation de la température de 3°C réduit le comportement de couverture, tout en augmentant le comportement d'abri (Dumont et al., 2007, Zhang et al., 2017). Lorsque l'oursin *Lytechinus variegatus* est exposé à une augmentation de température chronique (pendant 10 jours), il couvre également moins son test pendant la journée (Brothers et McClintock, 2015).

Chez certaines espèces, la température influence également le réflexe de redressement qui nécessite une coordination neuromusculaire importante. Un coefficient d'activité de redressement est calculé sur base du temps nécessaire à l'animal placé sur sa face aborale (dorsale) pour se mettre sur sa face orale (ventrale) (Watts et Lawrence, 1986). L'étoile de mer *Luidia clathrata* montre une diminution de l'activité de redressement et de la capacité à manipuler et ingérer la nourriture lorsque la température ou la salinité diminue (Watts et Lawrence, 1986). L'espèce d'oursin *Lytechinus variegatus* montre également une diminution de l'activité de redressement avec une augmentation chronique de la température (pendant 10 jours). En effet, cette dernière vit proche de la limite supérieure de sa tolérance thermique et sa localisation dans le Golfe du Mexique l'empêche de migrer plus au Nord, ce qui la rend particulièrement sensible à l'augmentation de la température (Brothers et McClintock, 2015). Toutefois, une augmentation aiguë de la température (pendant 1 jour) n'affecte pas négativement son comportement, ce qui suggère que les réponses comportementales à des variations thermiques rapides peuvent différer de celles observées sous des conditions prolongées (Brothers et McClintock, 2015).

Enfin, la consommation d'oxygène et l'excrétion azotée sont également affectées par la température. *Ophiopholis mirabilis*, une ophiure des zones tempérées, voit ces deux processus augmenter avec la hausse de la température bien que cette espèce tolère des températures allant de -1°C à 22°C (Fang et al., 2015).

Le *Tableau 1* reprend les différents effets de la variation de température sur les échinodermes décrits précédemment.

Tableau 1. Synthèse des effets des variations de la température sur la croissance, le métabolisme, la mortalité, le comportement et le système immunitaire d'espèces d'échinodermes.

T°	Type d'impact	Effet	Espèces	Sources
↑	Croissance et métabolisme	↑ de la croissance	<i>Pisaster ochraceus</i>	Gooding et al., 2009
↑		Meilleure croissance qu'à basse température mais pas idéale	<i>Mesocentrotus nudus</i>	Agatsuma, 2020, Ding et al., 2020, Zhang et al., 2017
↑		↑ de la consommation d'oxygène et excrétion d'ammonium	<i>Ophiopholis mirabilis</i>	Fang et al., 2015
↑		↑ et ↓ de certains métabolites	<i>Patiria pectinifera</i>	Popov et al., 2016
↓		↓ des taux métaboliques	<i>Phataria unifascialis</i>	Morgan et Cowles, 1997
↑	Mortalité	↑	<i>Ophiopholis schayeri</i>	Christensen et al., 2011
↑	Comportement	↓ du comportement alimentaire	<i>Apostichopus japonicus</i>	Sun et al., 2018
↑		↑ du comportement alimentaire	<i>Pisaster ochraceus</i>	Gooding et al., 2009
↑		↑ du comportement alimentaire et activité	<i>Stichopus monotuberculatus</i>	Chen, 2022
↓		↓ de l'activité	<i>Phataria unifascialis</i>	Morgan et Cowles, 1997
↑		↓ du réflexe de couverture	<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	Dumont et al., 2007, Zhang et al., 2017
↑		↓ du réflexe de couverture	<i>Lytechinus variegatus</i>	Brothers et McClintock, 2015
↑		↓ du réflexe de redressement	<i>Lytechinus variegatus</i>	Brothers et McClintock, 2015
↓		↓ du réflexe de redressement	<i>Luidia clathrata</i>	Watts et Lawrence, 1986
↑		Système immunitaire	↓ de l'activité bactéricide	<i>Apostichopus japonicus</i>
↑	↓ de la capacité phagocytaire		<i>Parastichopus regalis</i>	Galimany et al., 2018
↑	↓ de la capacité phagocytaire		<i>Apostichopus japonicus</i>	Wang et al., 2008
↑	↓ de l'activité bactéricide		<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	Brothers et al., 2016
↑	↓ de la capacité phagocytaire		<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	Brothers et al., 2016

2. Les holothuries : importance écologique et économique

2.1. Contribution des holothuries à l'écosystème marin

Les holothuries sont suspensivores, dépositivores et psammivores. La plupart des holothuries tropicales ingurgitent du sédiment grâce à leurs tentacules, sédiment duquel elles extraient la matière organique (Massin et Jangoux, 1976, Tortonese et Vadon, 1987, Uthicke, 2001). Certaines holothuries peuvent ingérer environ 4600 kg de poids sec de sédiment par an sur une surface de 1000 m², ce qui représente environ 5 mm d'épaisseur sur toute la surface (Uthicke, 1999). Les composés organiques présents dans le sable sont digérés et les composés minéraux du sable ressortent par l'anus. Cette action dite de « bioturbation », c'est-à-dire le mélange et le recyclage de la matière organique sédimentée, a également pour effet d'oxygéner le sédiment, faisant de ces organismes des ingénieurs écosystémiques importants (Emiroğlu et Günay, 2007, Conand, 1994). Les holothuries relâchent également de l'azote, principalement sous forme d'ammonium, et de petites quantités de phosphate. L'excrétion se fait directement à travers le tégument ou lors de l'éjection d'eau par l'anus (Mercier et Hamel, 2022). Ce processus joue un rôle important dans le recyclage des nutriments. Bien que les holothuries consomment une partie des microalgues benthiques, en densité de population naturelle, l'enrichissement en ammonium a un effet globalement bénéfique sur les algues (Uthicke, 1998). Il a récemment été démontré qu'une grande abondance d'holothuries est généralement indicateur d'un récif corallien sain, mettant en évidence l'importance de ces organismes dans la conservation des écosystèmes récifaux (Clements et al., 2024).

2.2. Importance économique des holothuries et aquaculture

Les holothuries sont très prisées sur les marchés asiatiques. Une cinquantaine d'espèces sont exploitées dans 70 pays à différentes fins et ce nombre ne cesse d'augmenter au fil des années (Conand, 2006, Toral-Granda et al., 2008, Purcell, 2010). La plupart des holothuries sont transformées en « trévang » après éviscération, décalcification et séchage du tégument, mais elles peuvent également être consommées sans transformation ou dérivées en produits comme des huiles, des cosmétiques ou des produits thérapeutiques (Purcell et al., 2023). La Chine est le plus gros producteur et consommateur de trévang mais d'autres pays d'Asie comme le Japon, la Corée du Sud, l'Indonésie, les Philippines, le Vietnam, la Thaïlande et la Malaisie possèdent un commerce d'aquaculture (Ru et al., 2018, Lee et Choi, 2020, Perez et Brown, 2012). Les holothuries constituent une source de revenus pour de nombreux pêcheurs locaux et sont également cultivées et pêchées de manière industrielle ou semi-industrielle. La majorité de

la production est exportée vers Singapour et Hong Kong (Perez et Brown, 2012, Xu et al., 2015).

L'absence de stratégies de gestion et de conservation efficaces, ainsi que le manque de connaissances, ont conduit à une surexploitation et à l'épuisement des stocks dans de nombreux pays d'Asie du Sud-Est (Purcell et al., 2023). Pour pallier la surpêche et répondre à la demande croissante, de nombreux pays ont développé l'aquaculture des holothuries (Uthicke, 2004). Ainsi, la production mondiale a triplé entre 1995 et 2012 (Rahman et al., 2015). Cependant, des connaissances approfondies sur les espèces, ainsi que des environnements marins adéquats, sont essentiels pour maintenir des aquacultures pérennes (Jimmy et al., 2012). Bien que la plupart des holothuries commercialisées se trouvent en régions tropicales, certaines espèces se trouvent en régions tempérées ou polaires (Purcell et al., 2023). C'est le cas pour l'espèce tempérée *Apostichopus japonicus*, produite en Asie du Nord-Est (Chine, Japon, Corée du Sud), dont les valeurs nutritives et thérapeutiques sont très appréciées et dont la valeur économique a considérablement augmenté entre 1998 et 2017, atteignant un rendement de 63,1 milliards de dollars en 2016 (Xu et al., 2015, Ru et al., 2018, Purcell et al., 2023). Néanmoins, contrairement aux espèces tropicales, *A. japonicus* possède une croissance plus lente avec une phase d'estivation durant laquelle l'animal relargue son tube digestif et arrête de s'alimenter, ce qui se montre désavantageux dans un cadre d'aquaculture (Ji et al., 2008, Yang et al., 2005).

En réponse à la surpêche des holothuries et dans un but commercial, des projets d'holothuriculture ont été initiés en 1999 à Madagascar, avec un accent particulier sur *Holothuria scabra* (Conand, 1998, Conand et al., 1997). *H. scabra* est une espèce particulièrement prisée en aquaculture en raison de sa croissance rapide et de sa tolérance à des conditions environnementales variées (Lavitra et al., 2009). L'aquaculture de cette espèce s'est fortement développée dans ce pays, devenant une source importante de revenus pour les communautés locales. Des programmes de formation et de développement ont été mis en place pour améliorer les techniques de culture et promouvoir des pratiques durables, assurant ainsi la viabilité à long terme de cette activité (Conand, 2004).

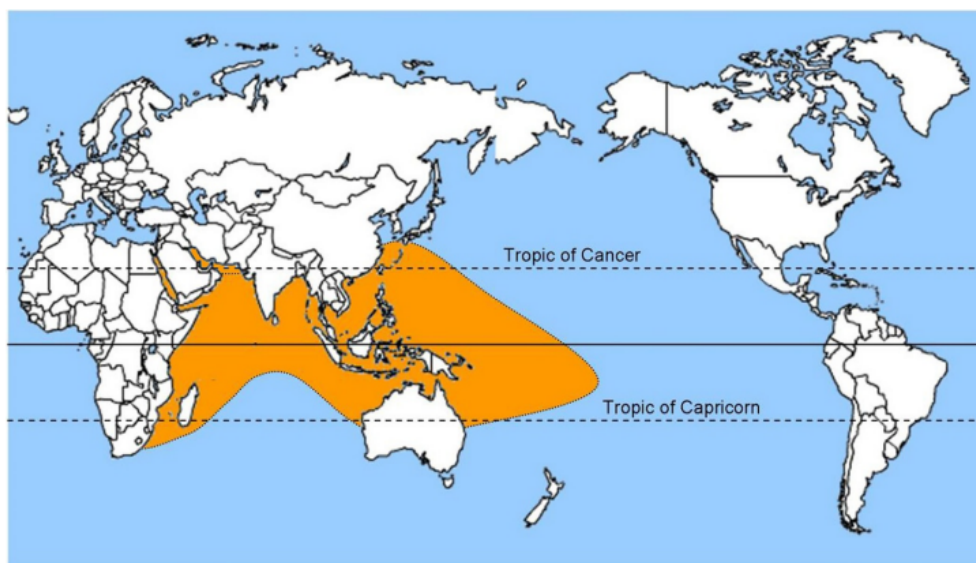
3. Biologie de l'holothurie *Holothuria scabra*

3.1. Distribution et habitat

H. scabra est une espèce d'eau peu profonde, vivant jusqu'à 20 mètres de profondeur (Purcell et al., 2012). On la trouve principalement dans l'Indopacifique tropical, à l'exception

d'Hawaï, depuis les latitudes 30°N et 30°S, jusqu'aux îles Fidji à l'est (*Figure 1*) (Purcell et al., 2012).

Les conditions de vie optimales pour *H. scabra* incluent une température proche de 28°C, une salinité de 33, une profondeur située entre 50 cm et 1 m, un pH de 8,1, un faible courant d'eau, un substrat sableux et une faible concentration en ammoniac (Jasmadi et al., 2018). Cette espèce préfère les eaux à faible salinité de l'océan Indien (James, 1994, James et James, 1994, Hamel et al. 2001). La limite inférieure de salinité pour sa survie est de 14, avec une mortalité de 50% à partir de 18, tandis que la limite supérieure est de 47 (Tuwo et al., 2020, Tuwo et al., 2021).



*Figure 1. Distribution connue d'*H. scabra* (d'après Bell et al., 2008).*

3.2. Morphologie générale

H. scabra (*Figure 2*) a une forme cylindrique légèrement allongée (Tortonese et Vadon, 1987). Sa couleur varie en fonction de son environnement : dans l'océan Indien, elle arbore un phénotype gris foncé avec des lignes transversales blanches, grises ou jaunes, et une face ventrale claire (Purcell et al., 2012, Mercier et Hamel, 2022). Cette espèce possède un épais tégument visqueux et granuleux au toucher (Mercier et Hamel, 2022). La bouche, située sur la face ventrale, est entourée d'une vingtaine de tentacules tandis que l'anus, situé à l'autre extrémité, est orienté légèrement plus dorsalement (Purcell et al., 2012, Mercier et Hamel, 2022).

En amont de sa bouche, cette espèce possède une couronne péripharyngienne d'où partent cinq bandes de muscles longitudinaux qui parcourent tout le corps (Carpenter et Niem, 1998, Purcell et al., 2012, Tortonese et Vadon, 1987). Les organes internes baignent dans le

liquide cœlomique, riche en cœlomocytes, qui remplit la cavité périviscérale (Purcell et al., 2012, Carpenter et Niem, 1998, Mary Bai, 1980, Tortonese et Vadon, 1987).

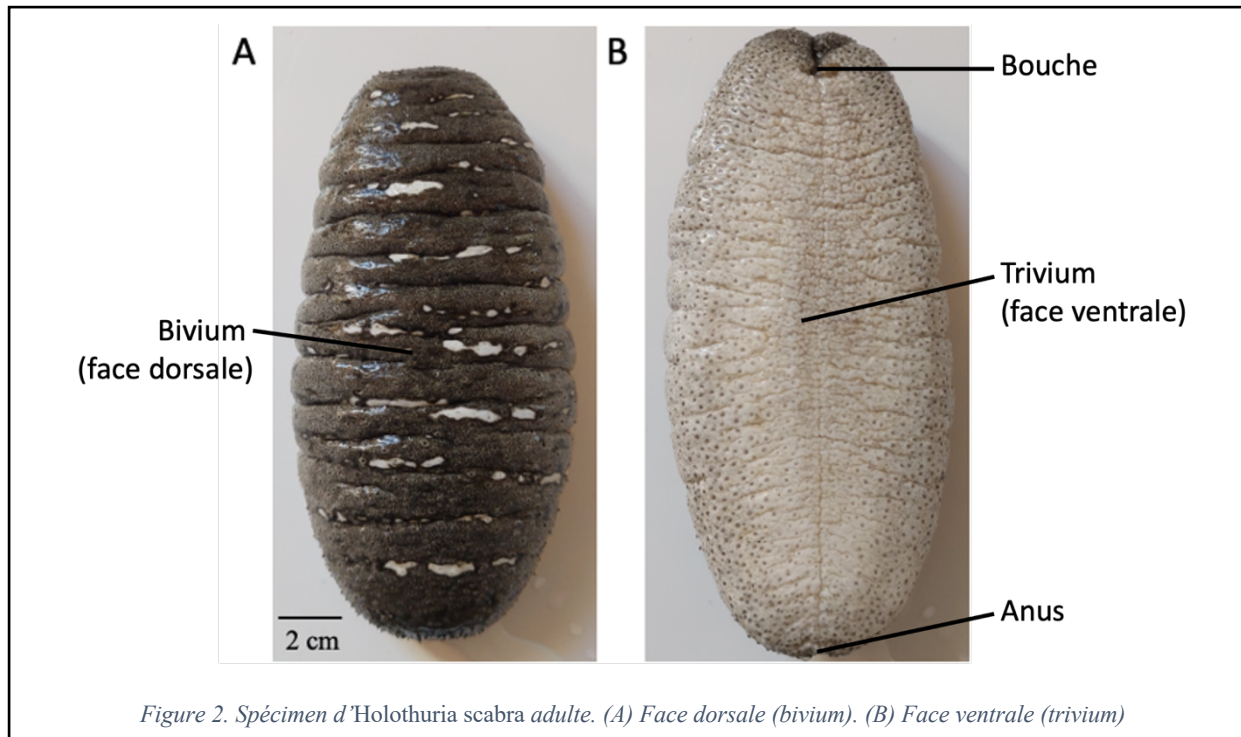


Figure 2. Spécimen d'*Holothuria scabra* adulte. (A) Face dorsale (bivium). (B) Face ventrale (trivium)

3.3. Systèmes

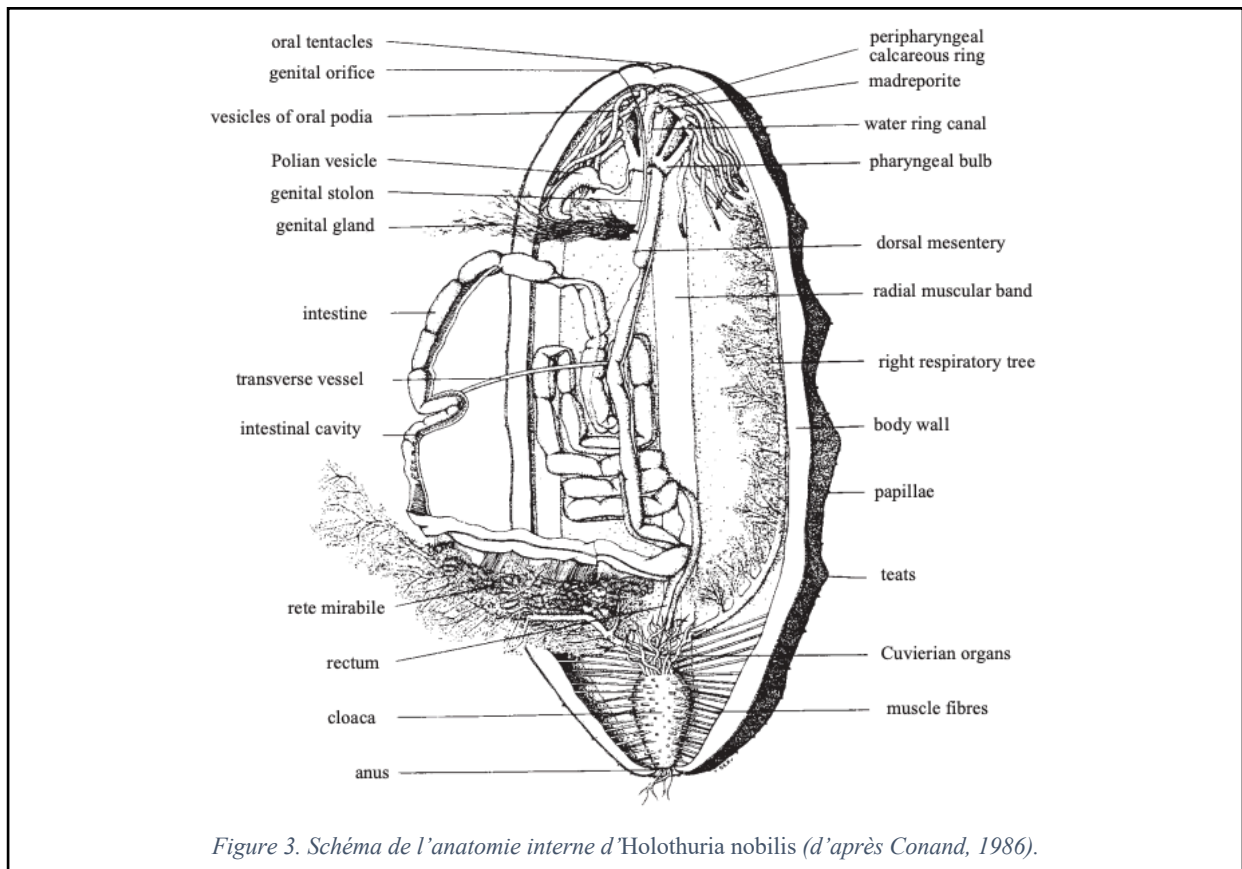
Le système digestif comprend une bouche, un pharynx, un œsophage, un estomac, un long intestin, un rectum, un cloaque et un anus (*Figure 3*) (Carpenter et Niem, 1998, Massin et Jangoux, 1976). *H. scabra* respire à travers son tégument et via deux arbres respiratoires reliés au cloaque (Purcell et al., 2012, Mary Bai, 1980).

On trouve également la vésicule de Poli et le canal du sable sur la partie antérieure de l'animal, intervenant dans le système aquifère de l'organisme (*Figure 3*) (Tortonese et Vadon, 1987).

L'animal se déplace sur le fond grâce à la contraction des muscles longitudinaux et circulaires, couplée à l'action simultanée des podia, ou pieds ambulacraires situés, sur la face ventrale (Tortonese et Vadon, 1987).

Le système circulatoire ou système hémal des holothuries est étroitement lié au système respiratoire (*Figure 3*) (Tortonese et Vadon, 1987). Ensemble, ils permettent l'absorption des nutriments, l'évacuation des déchets et l'oxygénation de l'animal (Ferguson, 1982). Le système hémal produirait également les cœlomocytes, c'est-à-dire les cellules immunitaires des holothuries. Il se compose de larges vaisseaux suivant les intestins, formant un maillage avec l'arbre respiratoire gauche (Carpenter et Niem, 1998). Le système est composé de deux sinus

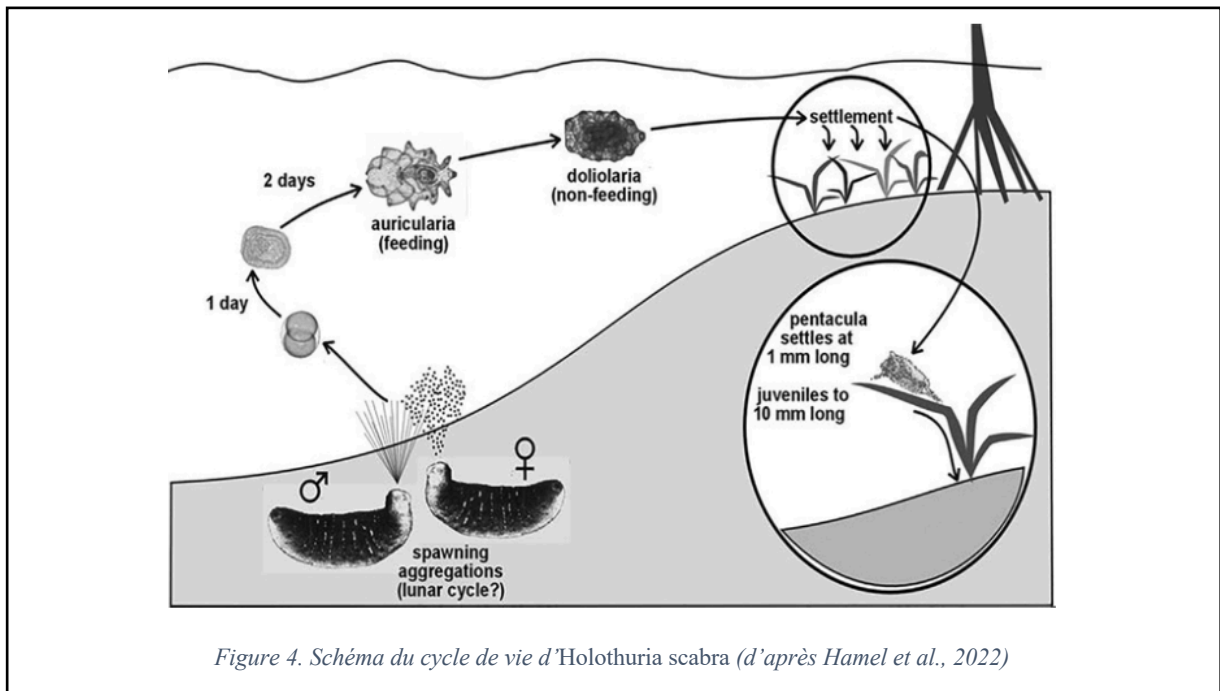
le long du tube digestif, un sur la face ventrale et l'autre sur la face dorsale. Le sinus dorsal forme le *rete mirabile*, un réseau de capillaires ramifiés, relié au système respiratoire (Herreid et al., 1976).



3.4. Reproduction, cycle de développement et croissance

Les holothuries sont gonochoriques, mais le dimorphisme sexuel est interne et peu marqué, sauf pendant la période de maturation (Carpenter et Niem, 1998). Il n'est en effet possible de distinguer le mâle de la femelle autrement que par un examen microscopique des gonades des spécimens adultes (Purcell et al., 2012). La gonade est prolongée par un gonoducte menant à l'orifice génital appelé gonopore, qui s'ouvre entre les tentacules buccaux (Carpenter et Niem, 1998, Tortonese et Vadon, 1987).

Quarante-huit heures après la fécondation externe, les œufs donnent naissance à des larves auricularia planctoniques d'un demi-millimètre (*Figure 4*) (Tortonese et Vadon, 1987, Hamel et al., 2022). Ces larves se métamorphosent en larves doliolaria, puis en pentactula benthique. On parle de juvénile après environ 1 mois, lorsque l'holothurie atteint 8 mm. Un spécimen adulte mesure entre 150 et 400 mm de long pour une masse variant entre 500 et 2000 g (Hamel et al., 2022).



4. Effets des variations de température sur *Holothuria scabra*

4.1. Comportement

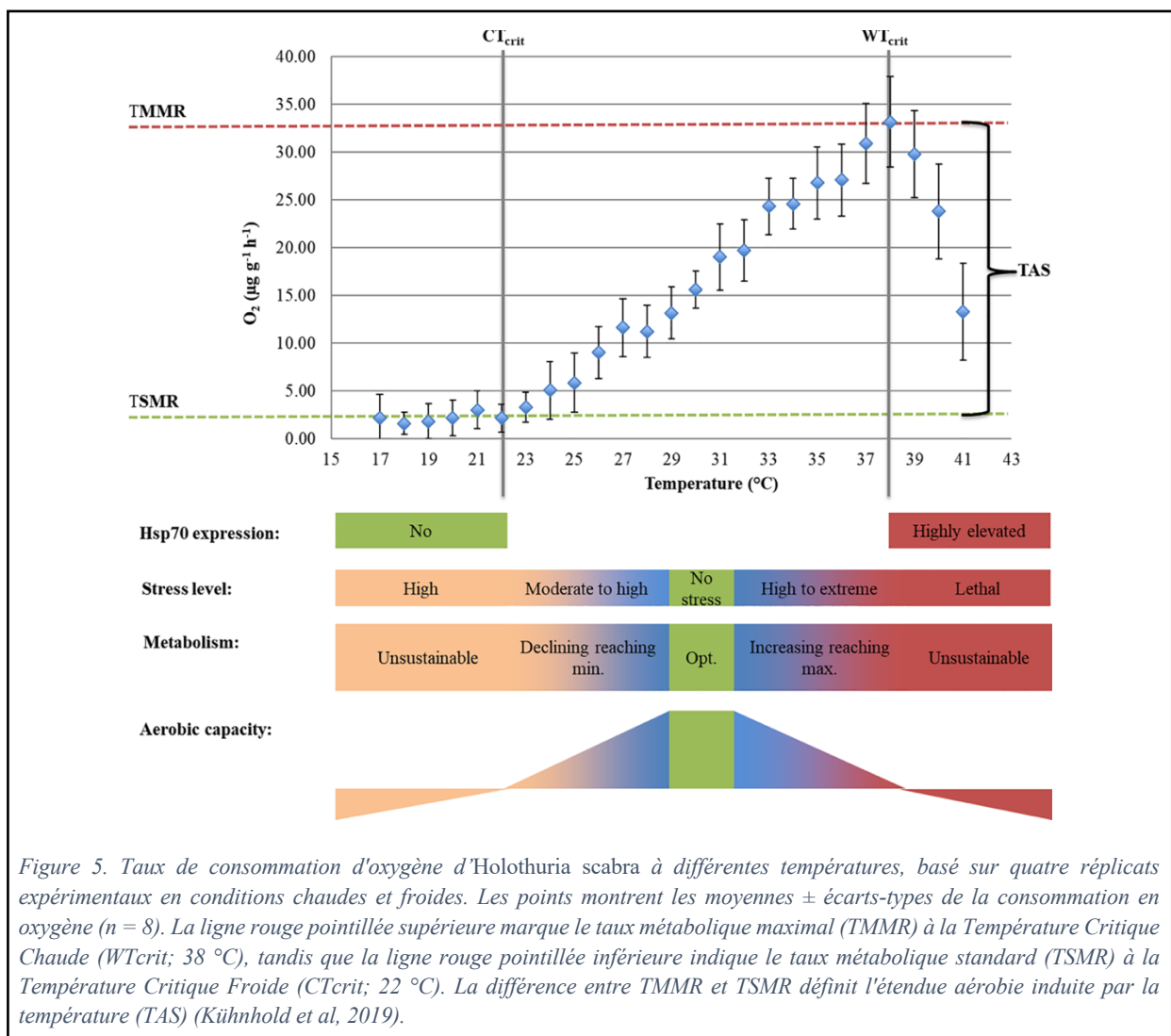
H. scabra présente un cycle journalier variable en fonction de l'âge (Mercier et al., 1999, Yamanouchi, 1956). Ainsi les juvéniles, ayant un cycle synchronisé avec la lumière, s'enterrent au lever du soleil et remontent à la surface du sédiment au coucher du soleil, probablement pour éviter la prédation (Mercier et al., 1999). Dans une étude de Wolkenhauer (2008), la température de l'eau, initialement maintenue à 24°C, a été progressivement réduite à 17°C. Cette baisse a conduit à un doublement des périodes d'enfouissement, passant de 6,7 h à 14,5 h par jour, tandis que l'activité alimentaire a chuté de 9,8 h à seulement 0,8 h par jour (Wolkenhauer, 2008).

Une autre étude sur *H. scabra* révèle que des températures élevées favorisent la croissance des juvéniles, cette croissance accrue étant liée à une augmentation du comportement de nourrissage. Les juvéniles survivent jusqu'à des températures d'environ 39°C, mais s'affaiblissent au-delà et meurent à 41°C (Lavitra et al., 2010).

4.2. Effets physiologiques et métaboliques

Les variations de température influent également sur les processus métaboliques de l'espèce. Une augmentation de la température entraîne une hausse des demandes énergétiques jusqu'à atteindre le Taux Métabolique Maximal induit par la Température (TMMR, en anglais), tandis qu'une diminution de la température provoque une baisse de ces demandes jusqu'à la limite basse qu'est le Taux Métabolique Standard induit par la Température (TSMR, en anglais)

(Figure 5). Un point de Température Critique Chaud (WTcrit, en anglais) existe où la consommation d'oxygène diminue en raison des capacités mitochondriales dépassées, entraînant une dépression métabolique et l'activation de la réponse cellulaire au choc thermique. De plus, le point Critique Thermique Froid (CTcrit, en anglais) correspond au seuil en dessous duquel les dépenses énergétiques deviennent intenable, bien qu'il n'y ait pas encore de stress thermique dû au froid. L'expression du gène codant pour la protéine de choc thermique (heat shock protein) Hsp70, en lien avec les taux de respiration, a été utilisée comme un indicateur complémentaire pour identifier les températures critiques. Au-delà du WTcrit, entre 39 et 41 °C, *H. scabra* montre une diminution progressive de sa respiration. À partir de 41°C, l'expression du gène Hsp70 augmente de façon significative. À ce seuil de température, le corps réagit en activant prioritairement la Réponse au Stress Thermique (HSR, en anglais) et une perturbation de l'homéostasie survient. Il existe donc une fenêtre aérobie dépendante de la température chez *H. scabra* (Kühnhold et al, 2019) (Figure 5).



4.3. Réponse immunitaire

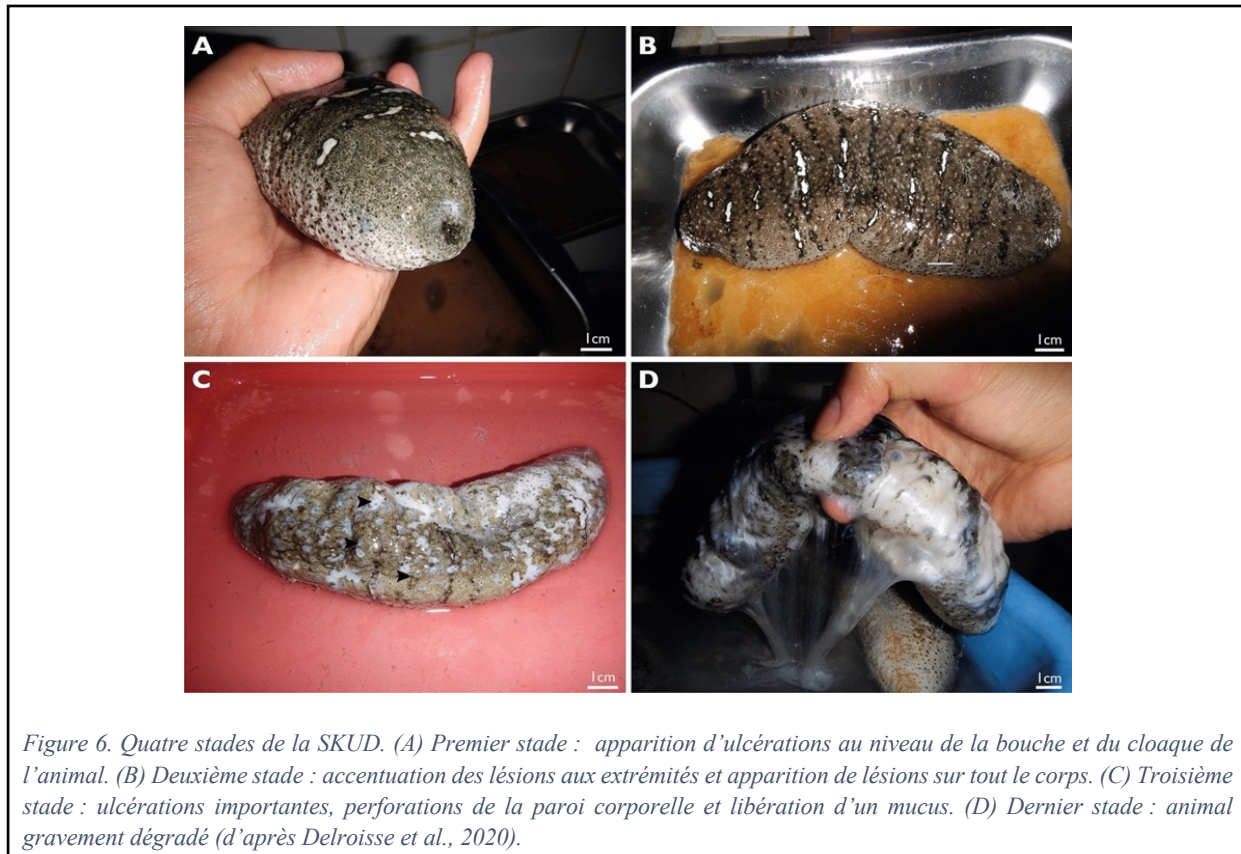
H. scabra, comme les autres échinodermes, possède deux types de réponses immunitaires complémentaires : la réponse cellulaire et la réponse humorale. La réponse cellulaire est assurée par les cœlomocytes, qui sont des cellules circulantes spécialisées présentes notamment dans la cavité cœlomique, et la réponse humorale, qui résulte de la production de molécules appelées facteurs humoraux également présents dans le liquide cœlomique (Chiaramonte et Russo, 2015, Chia et Xink, 1996). Les facteurs humoraux dans la réponse humorale peuvent être des lysines, des lectines, des agglutinines ou des cytokines (Cooper et Lemmi, 1981). Ils assurent les activités lytiques, agglutinantes et antimicrobiennes contre divers agents biologiques (Ratcliff et al., 1985, Chiaramonte et Russo, 2015).

Les cœlomocytes isolent les corps étrangers et induisent des mécanismes de dégradation ou d'élimination (Chia et Xink, 1996). Le mécanisme de phagocytose est l'un des principaux processus utilisés pour la reconnaissance et l'endocytose des particules étrangères par extension et fusion des pseudopodes autour du corps étranger (Chia et Xink, 1996, Prompoon et al., 2015, Ito et al., 1996). L'encapsulation est un autre mécanisme de défense impliquant plusieurs cœlomocytes qui permet d'éliminer les particules trop grandes pour être phagocytées (Bayne, 1990, Chia et Xink, 1996). Ce processus aboutit à la formation d'un « corps brun », un produit riche en mélanine, résultant de la dégradation du corps étranger par libération du contenu cellulaire des cœlomocytes (Pagliara et al., 2003, Prompoon et al., 2015). Enfin, la cytotoxicité, qui intervient dans le rejet de greffes tissulaires, est assurée par la sécrétion de substances toxiques pour détruire les tissus étrangers, sans impliquer de mécanisme de phagocytose (Chia et Xink, 1996, Hildemann et Dix, 1972).

4.4. Maladie SKin Ulceration Disease (SKUD)

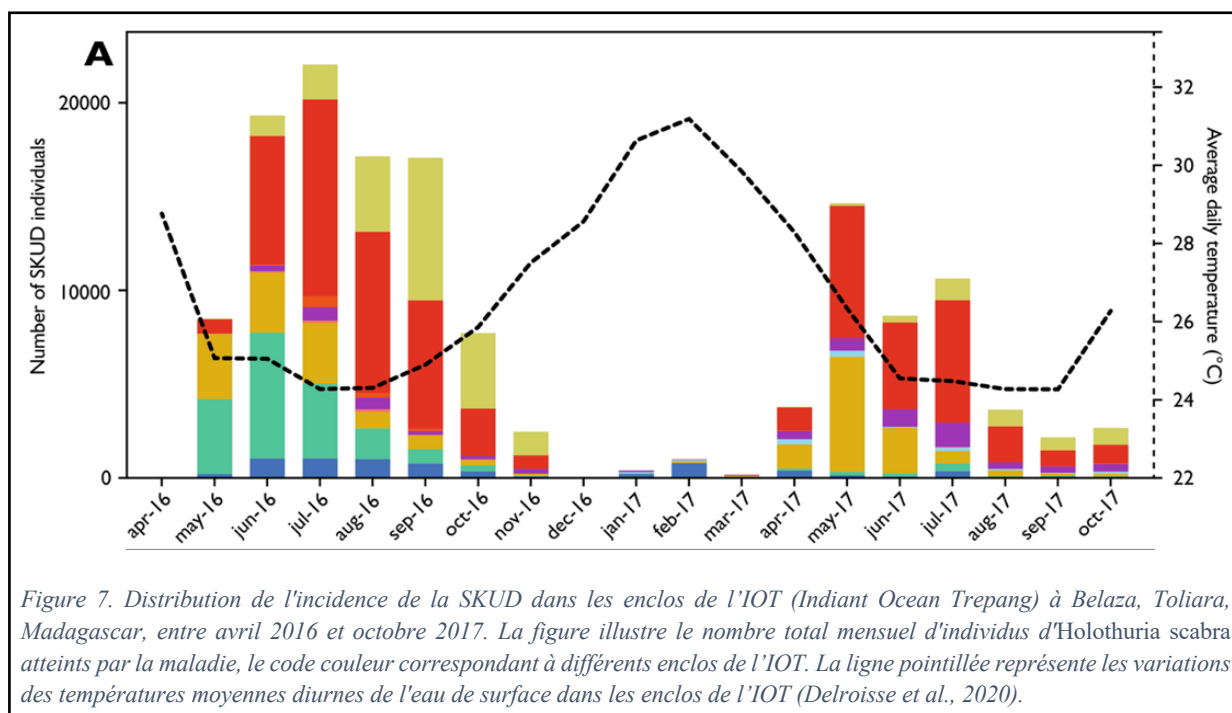
En conditions d'aquaculture, *H. scabra* est susceptible de développer la SKin Ulceration Disease (SKUD), une maladie du tégument qui affecte également d'autres espèces d'holothuries (Zhang & Liu, 1998). La SKUD se caractérise par une dépigmentation du tégument et la sécrétion d'un mucus abondant, donnant à la zone touchée un aspect gélatineux. Cette maladie peut rapidement conduire à la mort de l'individu infecté. Au premier stade, la maladie affecte le cloaque et la bouche de l'animal, avec des lésions ne dépassant pas 0,5 cm de diamètre (*Figure 6A*). Un individu atteint au deuxième stade présente des lésions blanches plus larges tout autour du corps et les ulcérations au niveau des extrémités s'accroissent (*Figure 6B*). Le troisième stade se caractérise par un corps entièrement couvert d'ulcérations, ces dernières étant présentes à la fois sur le tégument dorsal et ventral. Ces ulcérations, de plusieurs centimètres

de diamètre, peuvent libérer un mucus blanchâtre transparent. À ce stade, des perforations de la paroi corporelle apparaissent et des éviscérations sont également observées (*Figure 6C*). Au quatrième et dernier stade, l'état de l'animal est gravement dégradé, le corps présentant des trous à travers lesquels des organes internes ainsi qu'un mucus blanchâtre peuvent s'échapper. Les signaux vitaux ne sont plus perceptibles (*Figure 6D*) (Delroisse et al., 2020).



Les analyses des ulcères ont révélé la présence de bouchons de fibres de collagène et de bactéries de la famille des Vibrionaceae (Gammaproteobactéries) (Delroisse et al., 2020). Bien que la SKUD ait d'abord été considérée comme une maladie contagieuse résultant d'une infection bactérienne, des études ultérieures ont déterminé que la cause de cette maladie peut être de nature biotique ou abiotique (Becker et al., 2004, Delroisse et al., 2020). En effet, en fonction de l'espèce d'holothurie concernée, l'ulcération cutanée peut être provoquée par des bactéries ou des virus, mais peut également survenir en absence de pathogènes. La température, la salinité ou un sédiment enrichi en différents types de matières organiques de nature animale peuvent être à l'origine de l'apparition de la maladie (Zhang et Liu, 1998, Lavitra et al. 2009, Eeckhaut et al. 2019). Delroisse et al. (2020) concluent que les cas de SKUD rencontrés dans leur étude ne proviennent pas d'un pathogène car le contact d'un individu malade n'affecte pas un spécimen sain. Par ailleurs, une exposition répétée et prolongée au froid pourrait affaiblir les

défenses immunitaires de l'organisme pouvant ainsi favoriser l'installation de bactéries opportunistes dans le derme, exacerbant l'ulcération (*Figure 7*) (Delroisse et al., 2020).



L'activité phagocytaire (proportion des cellules phagocytées) et l'indice de phagocytose (quantité de matériel phagocyté par cellule) des cellules cœlomiques sont comparés entre des spécimens sains d'*H. scabra* et des spécimens atteints de la SKUD à des stades peu avancés (Zhao et al., 2017). Les cœlomocytes des animaux sains présentent un taux de phagocytose supérieur à celui des animaux malades (66%-10% et 38%-5%, respectivement). Cependant, l'indice de phagocytose des cœlomocytes des organismes sains sont légèrement inférieurs à ceux des organismes malades (0,7-0,1 et 0,9-0,1, respectivement) (*Tableau 2*). Cela suggère que la quantité de cœlomocytes est moins importante chez les individus malades mais qu'ils participent plus activement à la phagocytose. De plus, le taux de phagocytose diminue davantage lorsque la maladie est à un stade avancé (Zhao et al., 2017).

Tableau 2. Taux de phagocytose et indice de phagocytose de spécimens d'*Holothuria scabra* sains et malades (d'après Zhao et al., 2017).

	Taux de phagocytose	Indice de phagocytose
Sains	66%-10%	0,7-0,1
Malades (stade I-II SKUD)	38%-5%	0,9-0,1
Malades + graves	Diminution encore plus forte	

Dans le but d'améliorer les connaissances sur *H. scabra*, notamment en raison de son importance économique, il est utile de s'intéresser à l'impact du stress thermique et immunologique combinés en adoptant une approche métabonomique.

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE

Sur base de travaux précédents du Laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme, l'hypothèse de base de ce travail est qu'un stress thermique combiné à une exposition à des bactéries opportunistes peuvent induire la Skin Ulceration Disease (SKUD) chez l'holothurie *Holothuria scabra* et ainsi mener à la mort des individus.

L'objectif de ce mémoire est d'étudier l'effet indépendant ou synergique d'un stress immunologique et d'un stress thermique sur la physiologie, le comportement et le métabolisme de juvéniles d' *H. scabra* et de vérifier l'hypothèse précisée ci-dessus. Le stress thermique consiste en deux conditions, une froide à 22°C et une chaude à 33°C, qui constituent des limites thermiques basses et hautes de l'espèce précédemment établies, en adéquation avec la réalité écologique de l'espèce à Madagascar. Le stress immunologique est induit par des injections d'eau de mer non-stérile.

L'effet de ces stress est étudié à différents niveaux afin d'avoir un approche holistique de la réponse des juvéniles d'*H. scabra*. Tout d'abord, différents suivis sont réalisés comme la l'évolution de la masse des individus au cours de l'expérience ainsi que l'émergence potentielle de la SKUD ou d'éventuelles mortalités. Ensuite, les stress sont étudiés au niveau comportemental à l'aide d'un suivi de la mobilité des juvéniles. Finalement, une étude métabonomique des juvéniles est réalisée afin d'évaluer l'impact métabolique des stress thermique et immunologique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Madagascar Institut Halieutique des Sciences Marines (IHSM)

Dans le cadre de ce mémoire, une expérience a été réalisée en réplikat (R1 et R2) sur 66 juvéniles *H. scabra* obtenues par l'entreprise d'aquaculture IOT (Indian Ocean Trepang) (*Figure 8*). À leur livraison, les animaux pesaient en moyenne $26,8 \pm 6,0$ g (masse fraîche) et provenaient d'enclos situés sur l'estran en face de la station marine de Belaza. Les réplikats sont réalisés à deux jours d'intervalle l'un de l'autre.



Figure 8. Localisation de l'Indian Ocean Trepang (IOT) à Madagascar (modifié de Google Earth).

1.1. Design expérimental

Trois conditions de température - froide, contrôle et chaude - sont testées durant cette expérience (*Figure 9 et 10*) sous stress immunologique et en absence de stress immunologique. Les températures chaudes sont obtenues dans les bassines contenant des résistances Nicrew de 200W réglées à 34°C, les températures normales sont obtenues dans les bassines laissées à température ambiante et les bassines des températures froides sont placées dans une salle climatisée à 22°C. Des senseurs de température (UA-002 Onset, HOBO) sont placés dans les bassines de chaque condition afin de pouvoir vérifier les variations de température.

1.2. Acclimatation

Les holothuries sont pesées avant d'être placées dans trois grands bacs d'acclimatation pendant 5 et 7 jours (R1 et R2) afin de minimiser le stress du transport entre l'IOT et l'IHSM (Institut Halieutique de Sciences Marines). La température de l'eau varie entre 27,3 et 27,7°C et la salinité de 35,5 à 35,7. Les bacs sont pourvus d'un système d'aération et d'une couche de sédiment récupéré à Belaza, lieu de croissance des holothuries provenant de l'IOT. Dans chacun des deux bacs jaunes dont la surface est d'environ 5238 cm² (97 cm x 54 cm), 26 holothuries sont placées en acclimatation sur une couche de sédiment d'environ 1 à 2 cm d'épaisseur. Les 20 holothuries restantes sont placées dans le troisième bac, également recouvert de sédiment, dont la surface est d'environ 4200 cm² (70 cm x 60 cm). Après avoir été pesées, les holothuries ne sont plus stressées avant d'être placées dans les bassines de l'expérience après 5 jours d'acclimatation pour le premier réplicat et 7 jours pour le deuxième.

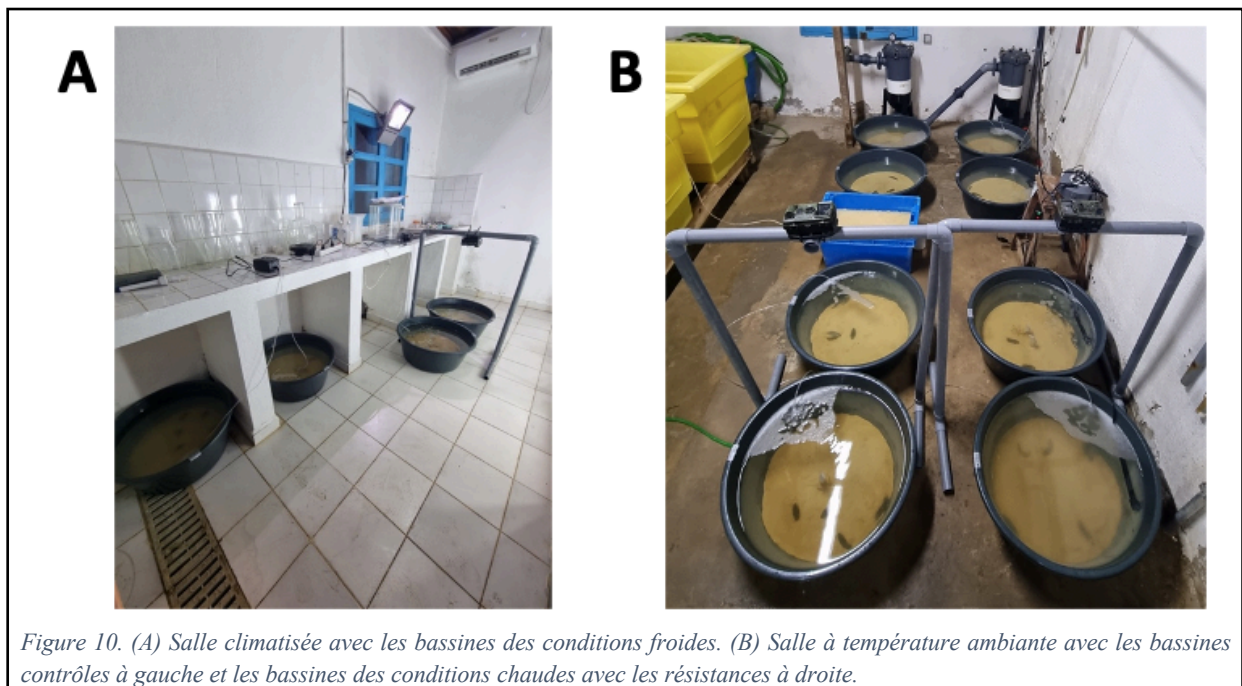
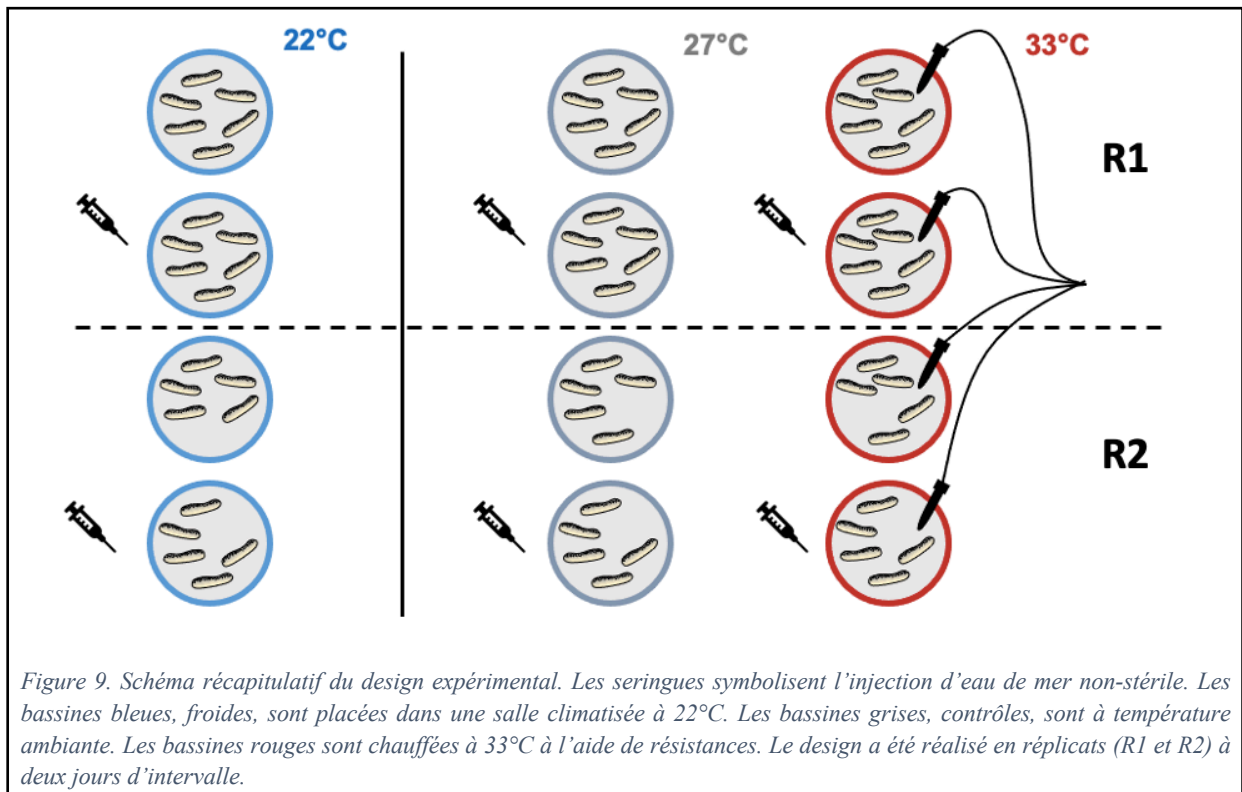
1.3. Mise en bassines

Douze bassines de 1720 cm² de surface au fond (46,8 cm de diamètre) sont utilisées, chacune remplie avec 30 L d'eau de mer et une couche de sédiment de 1 à 2 cm d'épaisseur provenant de Belaze (*Figure 10*). Les bassines sont réparties en deux réplicats de six bassines chacun. Dans chaque réplicat, les bassines sont divisées en trois conditions de température : 22°C, 27°C, et 33°C. Pour chaque température, deux conditions d'immunostimulation sont appliquées : une bassine contenant des holothuries injectées avec de l'eau de mer non-stérile (immuno+), et une autre contenant des holothuries non injectées (immuno-) (*Figure 9 et 10*).

Après l'acclimatation, 36 holothuries sont pesées et placées en conditions pour le premier réplicat (n = 6). En raison du développement de la SKUD chez certaines holothuries dans les bassins d'acclimatation, seulement 30 holothuries sont placées en conditions pour le deuxième réplicat (n = 5).

Afin d'éviter un choc thermique, l'eau de toutes les bassines de l'expérience est à température ambiante (température des bacs d'acclimatation) pour ensuite atteindre progressivement la température recherchée. La température des bassines du traitement « chaud » est obtenue en augmentant le thermostat des résistances 1 °C toutes les heures jusqu'à atteindre les 33°C recherchés. Les bassines des températures froides descendent jusqu'à 22°C en environ 12h. Les températures sont contrôlées tout au long de l'expérience à l'aide de HOBO.

Des changements d'eau de 10L sont également effectués tous les jours afin de maintenir la qualité de l'eau. Après le contrôle des paramètres, la salinité augmente plus fortement dans les bassines chaudes en raison de l'évaporation. La température dans ces bassines étant moins affectée par les changements d'eau grâce à la force des résistances, il est décidé de changer 15L d'eau tous les jours pour maintenir une salinité adéquate. Dans les bassines froides, seuls 5L sont changés afin de minimiser l'augmentation de température des bassines.



1.4. Caméras

Afin de pouvoir réaliser des trackings sur les individus, des caméras infrarouges Coolife H881 sont placées au-dessus des bassines. Les 3 conditions de température, immunostimulé ou non sont systématiquement prises en photos en même temps, soit les 6 bassines du réplicat. Les caméras utilisées sont paramétrées afin de prendre 1 photo toutes les minutes. Cinq sessions de photos sont réalisées par réplicat. En raison du comportement majoritairement nocturne des juvéniles, les caméras infrarouges sont lancées le soir aux alentours de 19h et sont éteintes le lendemain, après 6h du matin.

1.5. Pesée et suivi de développement de la SKUD

Un suivi de la masse et du développement de la maladie du tégument est réalisé durant toute la durée de l'expérience. Les holothuries sont pesées quatre fois : avant d'être placées en bassine, le jour des deux sessions de dissections et au milieu de l'expérience. Un suivi visuel du développement de la maladie est effectué tous les deux jours.

1.6. Injections

Afin de mimer l'effet de la SKUD chez les holothuries placées dans les bassines immuno+, des injections de 200 μ L d'eau de mer non-stérile sont réalisées à deux reprises dans les deux réplicats.

L'eau utilisée pour les injections est collectée en mer, à proximité du platier du Grand Récif de Tuléar, à environ 1m de profondeur, au-dessus d'un substrat sableux et est injectée dans l'heure aux holothuries afin qu'elle soit le plus similaire possible à l'eau du milieu naturel. Les injections se font grâce à une aiguille sur la face dorsale (bivium) de l'animal, au niveau du tiers supérieur (*Figure 11*). Les holothuries qui ne doivent pas être injectées sont tout de même sorties de l'eau afin de subir un stress similaire sans l'injection.



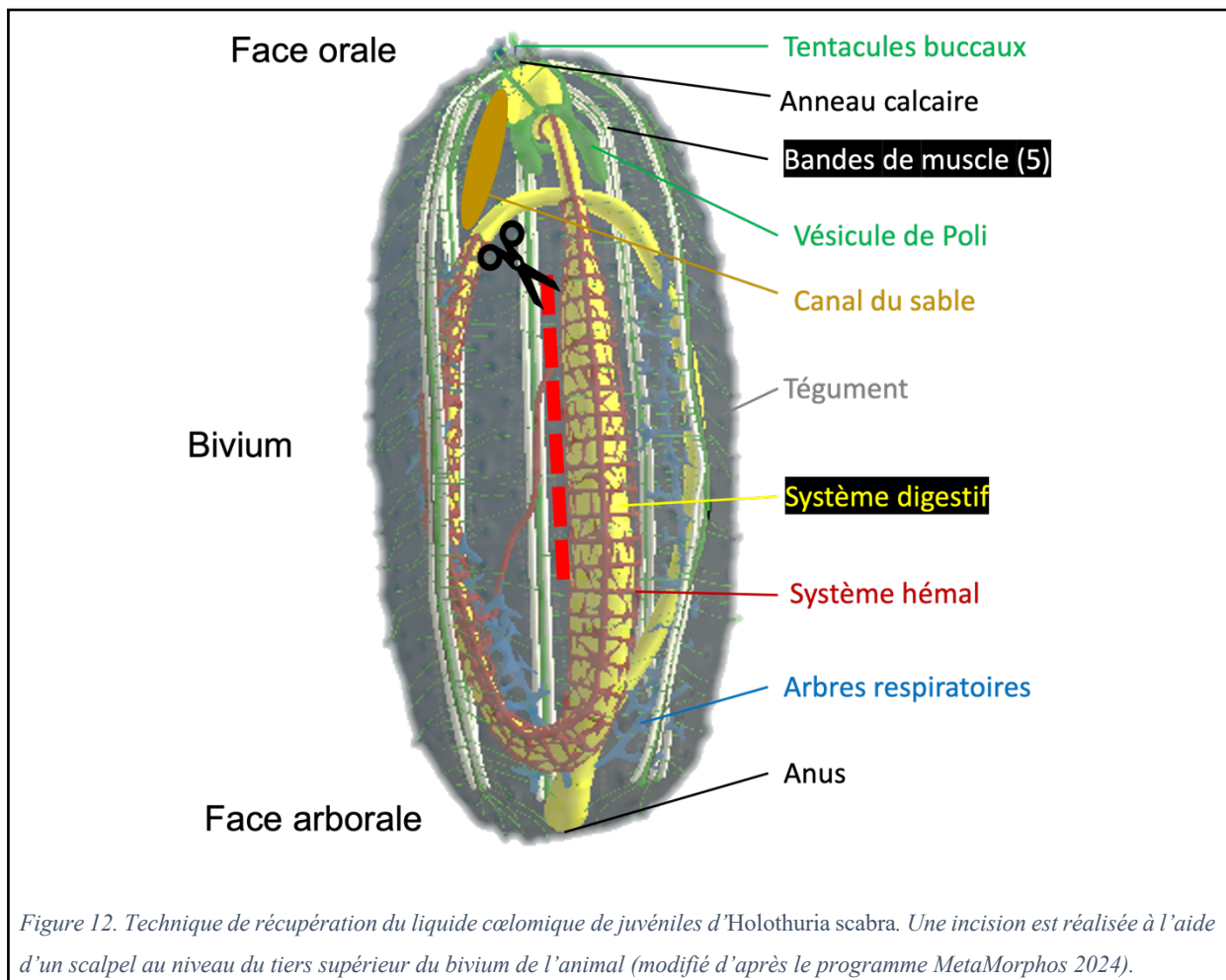
*Figure 11. Injection de 200 μ L d'eau de mer non-stérile chez les juvéniles d'*Holothuria scabra* immunostimulés.*

1.7. Dissections

Les dissections des holothuries ont lieu 24 heures après l'injection d'eau de mer afin de permettre une réaction immunitaire. Dans les bassines du réplicat 1, trois holothuries par

bassine sont disséquées, tandis que les trois restantes sont gardées pour un suivi de mortalité. Dans le cas du deuxième réplicat, lors de la première phase de dissection, trois holothuries par bassine sont disséquées, laissant deux holothuries par bassine pour le suivi. Si un individu développe la SKUD pendant l'expérience, il est disséqué lorsqu'il atteint le stade 3 de la maladie (*Figure 6C*). Deux individus ont donc été disséqués hors des phases prévues de dissections.

Après une photographie des bivium et trivium des spécimens, une incision au scalpel est pratiquée sur la face dorsale de l'individu au niveau du tiers supérieur afin de récolter le liquide cœlomique, dont la quantité est notée (*Figure 12*). Ensuite, 40 μ L de ce liquide sont prélevés et mélangés à 40 μ L d'une solution d'anticoagulant (eau de mer artificielle sans calcium ni magnésium et enrichie en acide éthylènediaminetétraacétique - EDTA 70 mM) dans un tube Eppendorf. Jusqu'à 2 mL de liquide cœlomique restant sont ensuite récupérés et placés dans un tube Eppendorf de 2 mL, puis centrifugés pendant 6 à 7 minutes à 6000 rpm.



La dissection se poursuit en ouvrant l'holothurie sur toute sa longueur. Le canal du sable est détaché et placé dans un tube Falcon de 15 mL contenant 3 mL de méthanol froid. Les

viscères, l'arbre respiratoire et la vésicule de Poli sont dégagés, et l'anneau calcaire est coupé pour accéder aux cinq bandes musculaires. Une pince est glissée sous les bandes musculaires pour les détacher et la musculature est divisée en deux parties : une moitié est placée dans un tube Falcon de 15 mL avec 3 mL de méthanol, et l'autre moitié est mise dans un tube Eppendorf de 2 mL pour la lyophilisation.

Une lamelle de 1 cm de tégument est ensuite découpée. Le tégument est essuyé des éventuelles traces de sédiments qui pourraient encore y être accrochées. La moitié de cette lamelle est placée dans un Falcon contenant 3 mL de méthanol, tandis que l'autre moitié est mise dans un Eppendorf pour la lyophilisation.

Pour l'analyse des coelomocytes, 10 μ L du mélange de liquide coelomique et de la solution anticoagulante réalisé plus tôt sont déposés sur une lamelle de comptage quadrillée. Une petite lamelle est placée sur cette dernière pour déterminer un volume précis. En comptant le nombre de cellules dans les cases, il est alors possible d'estimer la quantité de coelomocytes dans un volume donné. Huit des trente-deux carrés présents sur la lamelle sont photographiés de manière aléatoire pour des comptages ultérieurs. Ces comptages ne sont pas effectués dans le présent travail.

Après la centrifugation, le tube Eppendorf contenant le liquide coelomique est récupéré. Un culot s'est formé, et jusqu'à 1,5 mL de surnageant est délicatement prélevé. L'excédent de liquide est éliminé et 1,5 mL de RNAlater est ajouté au-dessus du culot. Ceci servira pour des analyses transcriptomiques, qui ne sont pas non plus traitées dans le cadre de ce mémoire.

Les trois tubes Falcon de méthanol (canal du sable, muscle et tégument), les deux tubes Eppendorf destinés à la lyophilisation (muscle et tégument), l'Eppendorf du surnageant ainsi que celui contenant le RNAlater sont conservés au congélateur, à -20°C . Les tubes Eppendorf sont lyophilisés avant de rentrer en Belgique. Tous les échantillons sont ramenés en Belgique et les tubes qui doivent être conservés au congélateur sont transportés dans une glacière pour les maintenir aussi froids que possible.

2. Plan d'analyse des résultats et tissus fixés

2.1. Pesées

Afin de pouvoir comparer les masses des deux réplicats et sachant que les individus du deuxième réplicat ont eu 2 jours de plus avant d'être mis en bassine pour le même temps que les individus du premier réplicat, une normalisation des masses est effectuée. Les masses des individus du réplicat R1 ont été normalisées par la moyenne de la masse initiale des bassines

correspondantes dans R1, tandis que les masses des individus du réplicat R2 ont été normalisées par la moyenne de la masse initiale des bassines correspondantes dans R2. Ainsi, les masses sont exprimées en pourcentage de la masse moyenne initiale. La masse a été mesurée 4 fois durant l'expérience. Des graphiques de suivi de la masse sont effectués sur *RStudio*, version 4.4.1 du logiciel. La normalité et l'homoscédasticité des données sont testées à l'aide des tests Shapiro-Wilk et Levene-Bartlett. La perte de masse en fonction du temps dans les 6 conditions est testée par un test de t apparié et l'impact de la température et de l'immunostimulation sont testés par une ANOVA à deux facteurs avec interaction. Les packages *dplyr*, *ggplot2* et *car* sont utilisés (Wickhamet et al., 2023, Wickhamet et al., 2024, Fox et al., 2023).

2.2. Suivi de l'apparition de la SKUD

Des graphiques en bâtonnets représentant les individus malades ou non dans chaque condition de température et d'immunostimulation sont effectués sur *RStudio*. Les packages utilisés sont : *ggplot2*, *dplyr* et *tidyr* (Wickhamet et al., 2024, Wickhamet et al., 2023, Wickhamet al., 2024).

2.3. Tracking

Pour suivre les déplacements des holothuries sur une plage horaire de 20h à 6h, le programme ImageJ2 version 2.14.0/1.54f est utilisé. Les photos sont importées dans l'application et une échelle est indiquée sur l'image afin de pouvoir mesurer le déplacement réel des holothuries. Seules les holothuries du premier réplicat (R1) sont traquées.

Ensuite, le plugin *Manual tracking* est utilisé avec un intervalle de temps de 60 secondes pour les conditions froides et 60,15 secondes pour les conditions tempérées et chaudes. La calibration des axes x et y est calculée à partir de l'échelle indiquée et le suivi est lancé en choisissant de suivre le centre de l'holothurie afin d'éviter de considérer les mouvements de tête fréquents comme un déplacement.

À 6h du matin, le suivi est arrêté, et les données sont sauvegardées dans un fichier Excel. Une capture d'écran du chemin parcouru est réalisée et les coordonnées du centre de la bassine sont également notées.

Les données des tracking permettent de réaliser des *boxplot* du déplacement total des holothuries et de leur vitesse moyenne en fonction de la température et de l'immunostimulation dans *RStudio*. La normalité des données des 6 conditions et l'homogénéité des variances sont testées grâce aux tests Shapiro-Wilk et Levene-Bartlett. Des tests statistiques paramétriques du type ANOVA II sont effectués afin de connaître l'impact des différentes conditions et de leur

potentielle interaction sur le déplacement total et la vitesse moyenne des animaux. Les variables de température et d'immunostimulation sont ensuite testées séparément à l'aide de test de t, ANOVA ou Kruskal-Wallis afin de voir si celles-ci peuvent avoir une influence de manière distincte. Des tests post-hoc de Tuckey HSP ou Mann-Whitney sont finalement appliqués. Les packages utilisés sont *ggplot2*, *dplyr*, *multcomp* et *car* (Wickhamet et al., 2024, Wickhamet et al., 2023, Hothorn et al., 2024, Fox et al., 2023).

2.4. Approche métabonomique

2.4.1. Extractions

Les analyses métabolomiques sont réalisées en collaboration avec le laboratoire de Biologie Humaine et Toxicologie de l'Université de Mons. Des tests préliminaires sont effectués sur les différents tissus récoltés lors des dissections d'*H. scabra*. Parmi ces tissus, les muscles sont sélectionnés pour réaliser les extractions et les analyses métabonomiques de ce mémoire. Tous les échantillons analysés proviennent de la première phase de dissections.

Des extractions sont effectuées afin d'extraire les différents métabolites présents dans 20 échantillons de muscles ainsi que d'un échantillon de tégument et un échantillon de canal de sable d'*H. scabra* (protocole issu de Lin et al., 2007). Les deux dernières extractions servent à créer une carte contenant les spectres métabonomiques de différents tissus ou liquides de l'espèce. Les échantillons utilisés ont été ramenés de Madagascar dans 3 mL de méthanol et ont été conservés à -80°C en Belgique jusqu'au moment des extractions. Les échantillons sont pesés, mélangés avec de l'eau distillée, puis vortexés et soniqués. Après l'ajout de chloroforme, les échantillons sont à nouveau vortexés, agités sur glace, puis centrifugés pour séparer les phases polaires et lipidiques. La phase polaire est récupérée et séchée, puis resuspendue dans du tampon phosphate-D₂O. Après homogénéisation, la solution est transférée dans des tubes RMN avec l'ajout d'une référence de calibration (TSP, acide triméthylsilylpropanoïque). La phase lipidique, plus dense, est également récupérée et placée dans de nouveaux Falcons. Cette dernière n'a pas été analysée dans le cadre de ce travail. Le liquide cœlomique récolté lors des dissections est également analysé par spectrométrie RMN pour la carte des spectres.

Les échantillons sont ensuite analysés en RMN à une dimension du proton via le spectromètre à RMN Bruker AVANCE™ III 600 MHz (générant un champ magnétique de 14,1T) dont la capacité de détection concerne les métabolites de taille inférieure à 1500 Da. Les spectres de la phase polaire ont été générés par une séquence d'impulsion en NOESYPRESAT-1D (avec présaturation du pic de l'eau) et ceux de la phase lipidique avec une séquence

d'impulsion en PROTON. Pour chaque échantillon, 256 scans sont effectués avec un gain de 101 et un délai de 4 secondes. Les signaux de précession libre ou FID (pour Free Induction Decay) résultant sont modifiés par une transformation mathématique de Fourier afin d'obtenir les spectres bruts. Seuls les spectres de la phase polaire sont analysés lors de ce mémoire.

2.4.2. Identification des métabolites sur Chenomx profiler

L'identification des pics est réalisée grâce au programme Chenomx profiler qui contient un large panel de molécules et leurs spectres correspondants.

2.4.3. Traitement des spectres

MestReNova

Le programme MestReNova est utilisé pour traiter les spectres. Une correction automatique est appliquée pour s'assurer que les pics se présentent uniquement vers le haut et que la ligne de base est correctement ajustée à zéro. Il est essentiel de vérifier que le TSP présente un pic singulet, symétrique, de faible largeur et positionné à une abscisse de zéro. Si ce n'est pas le cas, l'échantillon doit être repassé au spectromètre RMN car l'analyse des spectres ne sera pas correcte. Si nécessaire, une correction manuelle est appliquée à chaque spectre pour garantir la symétrie des pics et une ligne de base à zéro.

Une normalisation par l'aire totale sous la courbe de chaque spectre est effectuée au fichier sur Excel avant d'être importé dans SIMCA.

SIMCA : analyse non ciblée des spectres

Le logiciel SIMCA est utilisé afin de créer des modèles en composantes principales (PC). En utilisant le fichier Excel contenant les valeurs des intégrales correspondant aux aires sous la courbe de chaque sous-région spectrale, les ressemblances et différences entre groupes peuvent être identifiées. Le logiciel peut générer deux types de graphiques : l'un séparant les échantillons selon une PC1 et une PC2, dit *Scatter Plot*, et l'autre montrant les variables à l'origine de la différenciation des échantillons, dit *Loading Plot*, chaque point représentant une sous-région spectrale. Les deux graphiques sont analysés conjointement pour en tirer des conclusions.

Peak-picking et RStudio : analyse ciblée des spectres

Par ailleurs, comme les différences entre les spectres sont relativement peu marquées entre les conditions, un peak-picking est effectué sur les métabolites identifiés et sur les régions qui semblent le plus différer entre les spectres. La zone contenant le ou les pics du métabolite

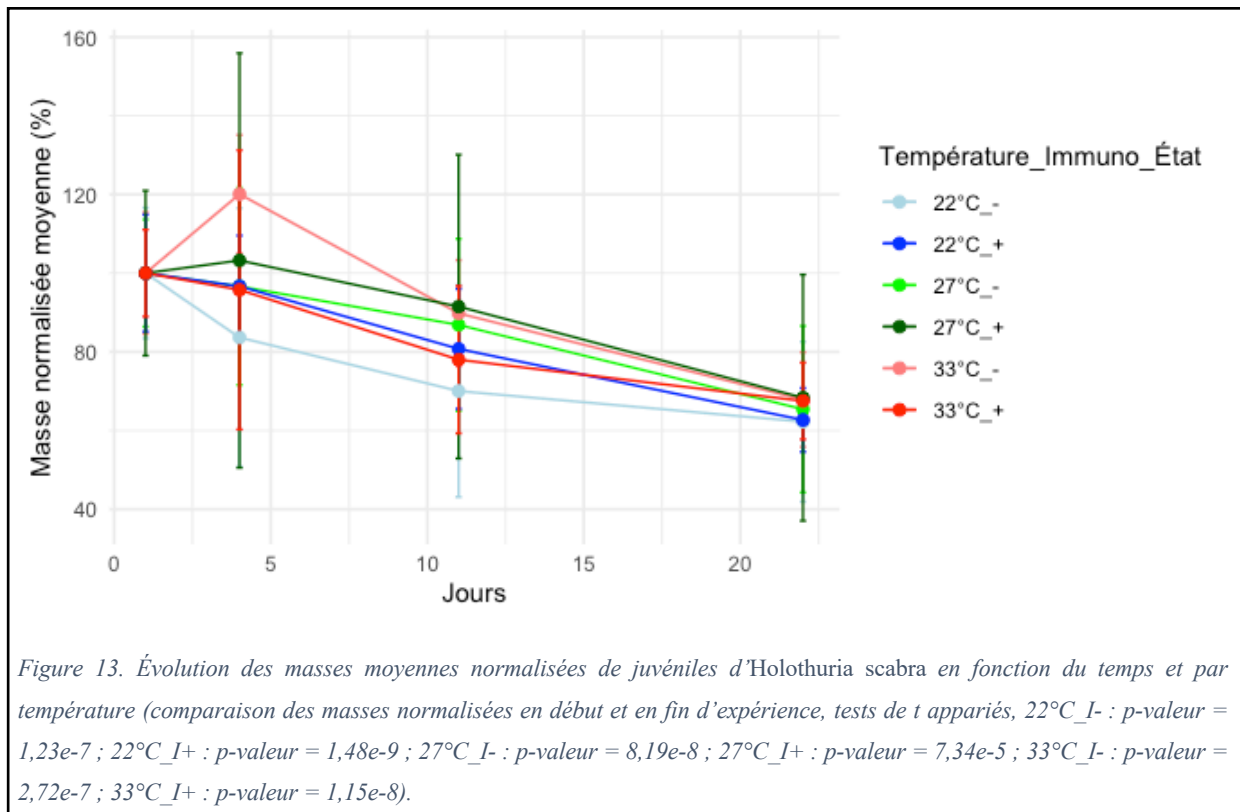
ciblé est sélectionnée sur chacun des spectres et l'aire sous la courbe est rapportée dans un tableau Excel. Cette manipulation est effectuée pour tous les métabolites d'intérêts. Les conditions de température, d'immunostimulation et de présence ou non de la maladie sont également indiquées dans le tableau avant que les données ne puissent être importées dans *RStudio*. Les packages *tidyverse*, *collapse*, *readxl* et *pheatmap* sont chargés afin de réaliser le heatmap (Wickham, 2023, Krantz et al., 2024, Wickhamet et al., 2023, Kolde, 2019). Pour chaque métabolite, des tests de normalité, du type Shapiro-Wilk, et d'homogénéité des variances, du type Levene-Bartlett, sont effectués pour les groupes de température, d'immunostimulation et de SKUD. En fonction des résultats de ces tests, des tests statistiques appropriés (ANOVA, Kruskal-Wallis, t-test ou Wilcoxon) sont réalisés pour évaluer les effets de ces facteurs sur les niveaux des métabolites. Les packages utilisés sont *ggplot2*, *dplyr*, *car*, *multcomp*, *ggpubr* et *PMCMPplus* (Wickhamet et al., 2024, Wickhamet et al., 2023, Fox et al., 2023, Hothorn et al., 2023, Kassambara, 2023, Wickhamet et al., 2024, Pohlert, 2023).

RÉSULTATS

1. Évolution de la masse

Le suivi de la masse des individus montre une décroissance sur un laps de temps de 21 jours dans toutes les conditions de température et d'immunostimulation (*Figure 13*) (tests de t appariés, les p-valeurs des 6 conditions sont inférieures à 5%). Au début de l'expérience, la masse des individus soumis à des conditions de température chaude sans immunostimulation (33°C_I-) et les individus injectés à l'eau de mer maintenu à 27°C (27°C_I+) a légèrement crû.

Les résultats de l'ANOVA à deux facteurs avec interactions indiquent que ni la température, ni l'immunostimulation ni l'interaction entre les deux n'ont un effet significatif sur la perte de masse (p-valeur = 0,373 ; p-valeur = 0,913 ; p-valeur = 0,511).



2. Suivi de l'apparition de la SKUD

Les stades de la maladie chez le juvénile d'*Holothuria scabra* sont redéfinis suite aux observations du terrain car ils sont légèrement différents de ceux de l'adulte (*Figure 14*). Le stade I présente de petites ulcérations sur le trivium (pas autour de la bouche et de l'anus contrairement à l'adulte). Les ulcérations sur le trivium se propagent sur l'ensemble de la face et ne touchent que très légèrement le bivium au stade II. Le stade III voit apparaître plusieurs

ulcérations sur le bivium. Le dernier stade induit des ulcérations qui perforent la paroi corporelle et l'animal s'éviscère.

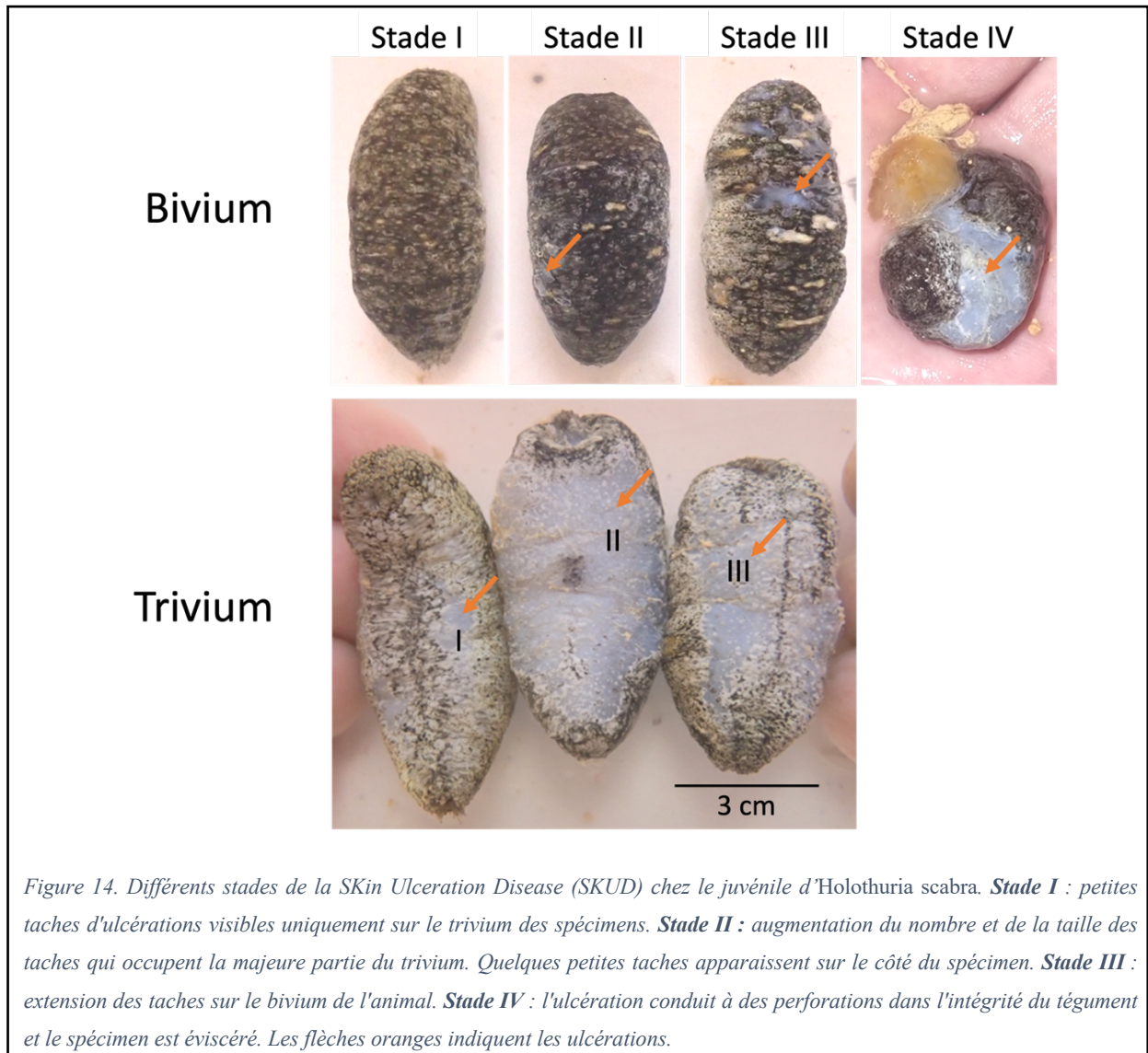
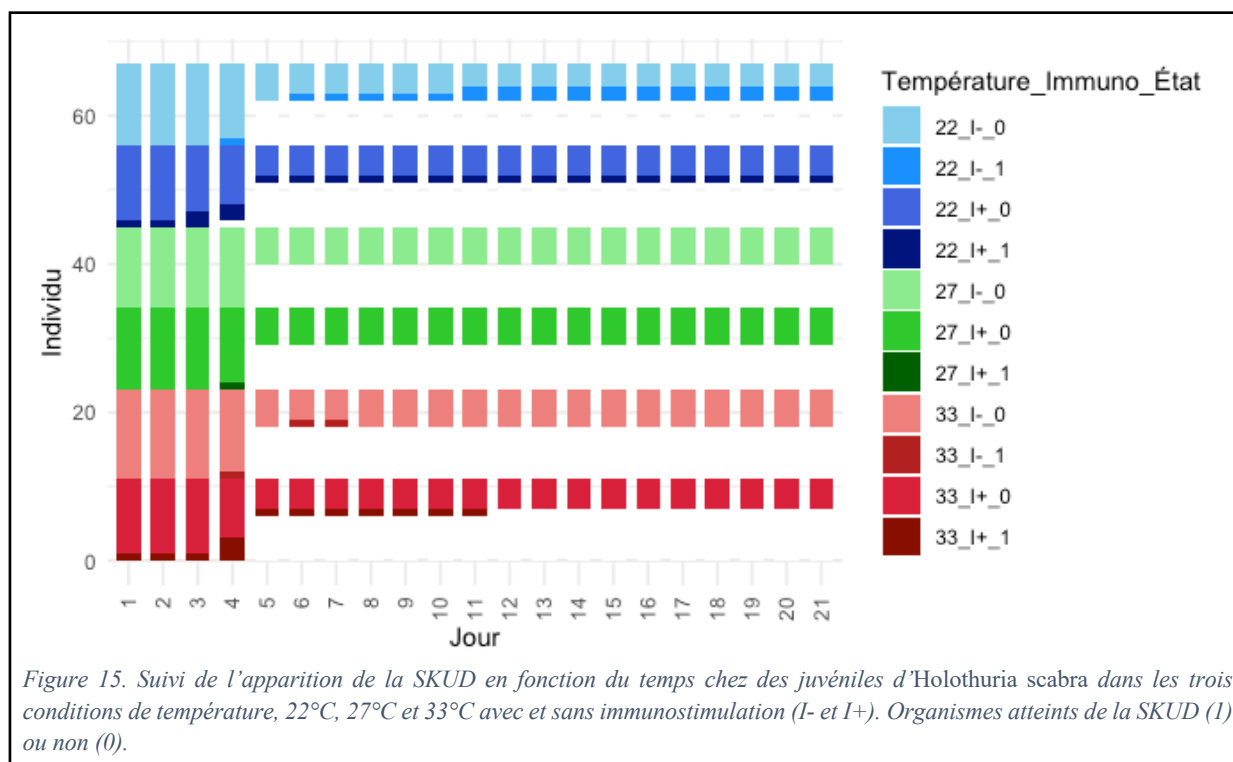


Figure 14. Différents stades de la SKin Ulceration Disease (SKUD) chez le juvénile d'*Holothuria scabra*. **Stade I** : petites taches d'ulcérations visibles uniquement sur le trivium des spécimens. **Stade II** : augmentation du nombre et de la taille des taches qui occupent la majeure partie du trivium. Quelques petites taches apparaissent sur le côté du spécimen. **Stade III** : extension des taches sur le bivium de l'animal. **Stade IV** : l'ulcération conduit à des perforations dans l'intégrité du tégument et le spécimen est éviscéré. Les flèches oranges indiquent les ulcérations.

La Figure 15 montre que les cas de SKUD apparaissent principalement dans les conditions de température froide et chaude. De plus, de nouveaux cas d'individus atteints de SKUD continuent d'apparaître dans les bassines à température froide tout au long de l'expérience, tandis qu'aucun nouveau cas n'a été observé dans la deuxième moitié de l'expérience dans les bassines à température chaude. Un seul cas de SKUD a été rapporté dans les bassines maintenues à 27°C avec immunostimulation. Aucun cas n'a été observé dans la bassine témoin (27°C, sans immunostimulation).



3. Tracking

Les tracking des holothuries permettent de calculer le déplacement cumulé moyen et la vitesse moyenne des organismes par bassine correspondant à une condition de température couplée à une condition d'immunostimulation.

Un effet significatif de la température sur la distance cumulative parcourue est observé (ANOVA II, p-valeur = 0,0001) mais pas d'effet de l'immunostimulation (p-valeur = 0,695) (Figure 16). L'interaction entre la température et l'immunostimulation n'est pas significative au seuil des 5% (p-valeur = 0,0521). Les comparaisons multiples réalisées par le test de Tukey HSD ont montré une différence significative entre le groupe contrôle (27°C sans immunostimulation) et le groupe 33°C sans immunostimulation (p-valeur = 0,0127).

Un test de t est également effectué afin de vérifier si le groupe des juvéniles qui ont été immunostimulés montrent des différences dans le déplacement cumulé par rapport au groupe qui n'a pas subi d'immunostimulation (n=9). Les résultats ne montrent pas de différences significatives entre les deux groupes (p-valeur = 0,8389).

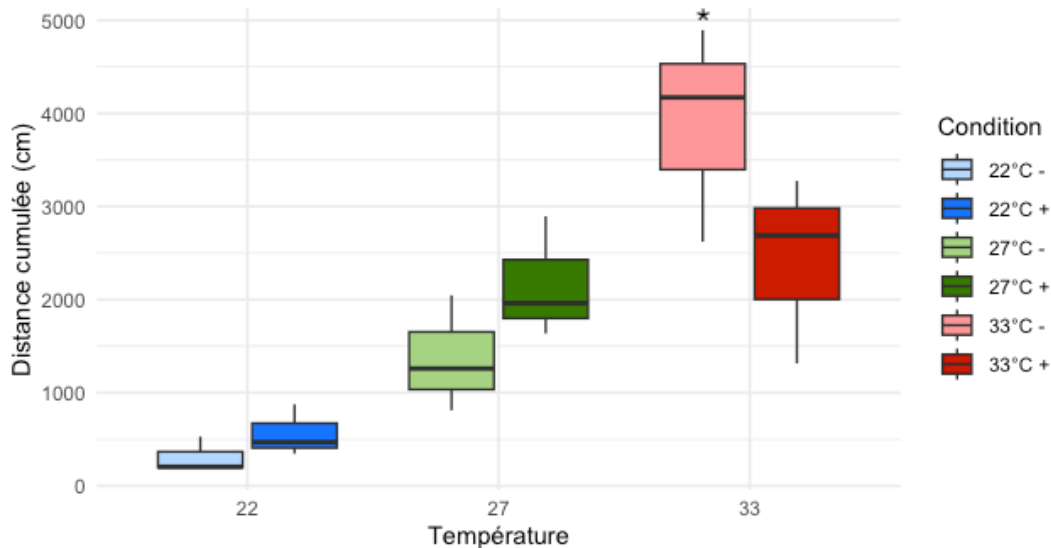
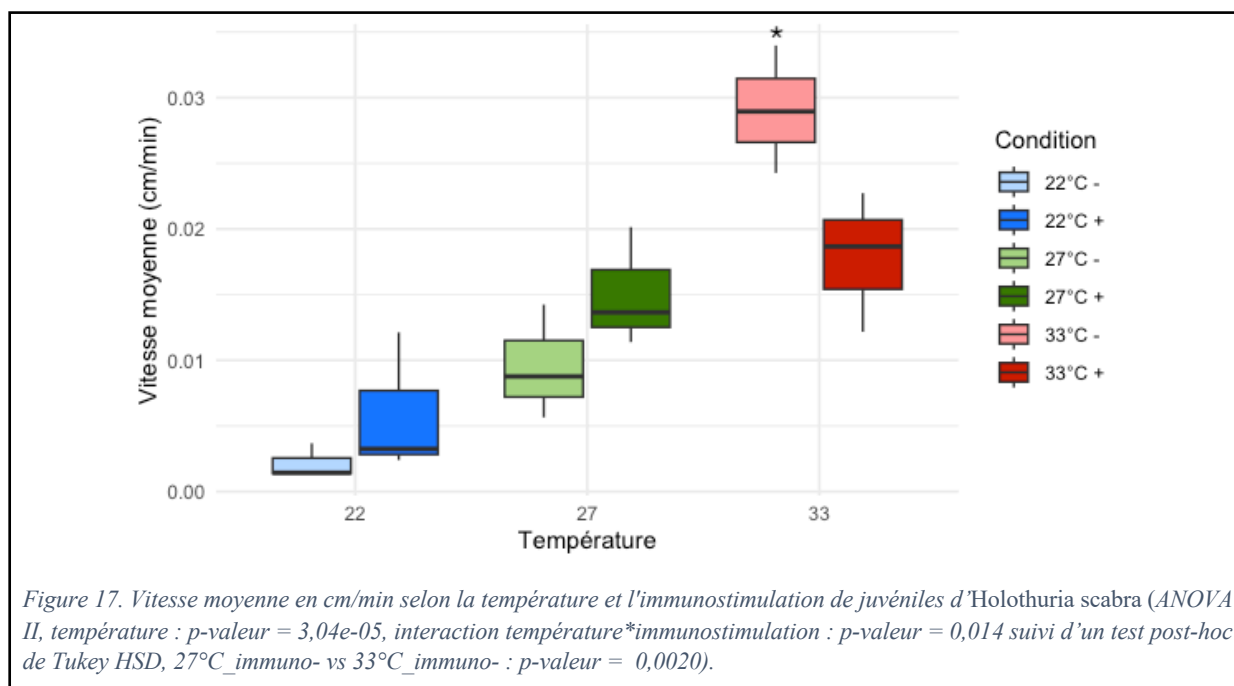


Figure 16. Distance cumulée en cm selon la température et l'immunostimulation de juvéniles d'*Holothuria scabra* (ANOVA II, température : p-valeur = 0,0001, suivi d'un test post-hoc de Tukey HSD, 27°C_immuno- vs 33°C_immuno- : p-valeur = 0,0127).

Le test statistique paramétrique du type ANOVA montre des différences significatives entre les groupes de température testés seuls sur le déplacement cumulé des holothuries (p-valeur = 0,0002). La comparaison par paires indique que les déplacements cumulés diffèrent significativement entre le groupe contrôle et le groupe froid (Tukey HSD : p-valeur = 0,0401) ainsi qu'entre le groupe contrôle et le groupe chaud (Tukey HSD : p-valeur = 0,0317).

Une ANOVA à deux facteurs avec interaction est ensuite réalisée pour évaluer l'effet de la température, de l'immunostimulation et de leur interaction sur la vitesse moyenne des holothuries. Les résultats montrent que la température a un effet significatif sur la vitesse moyenne (p-valeur = 3,04e-05). En revanche, l'effet de l'immunostimulation seule n'est pas significatif (p-valeur = 0,769). Cependant, l'interaction entre la température et l'immunostimulation s'est révélée significative (p-valeur = 0,014). Les comparaisons post-hoc via le test de Tukey HSD avec le groupe de référence (27°C sans immunostimulation) montrent également une différence significative avec le groupe 33°C sans immunostimulation (p-valeur = 0,0020) (Figure 17).

Un test de t est effectué pour vérifier si les groupes avec et sans immunostimulation testés seuls présentent des différences significatives au niveau de leur vitesse moyenne. Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les groupes (p-valeur = 0,8953).

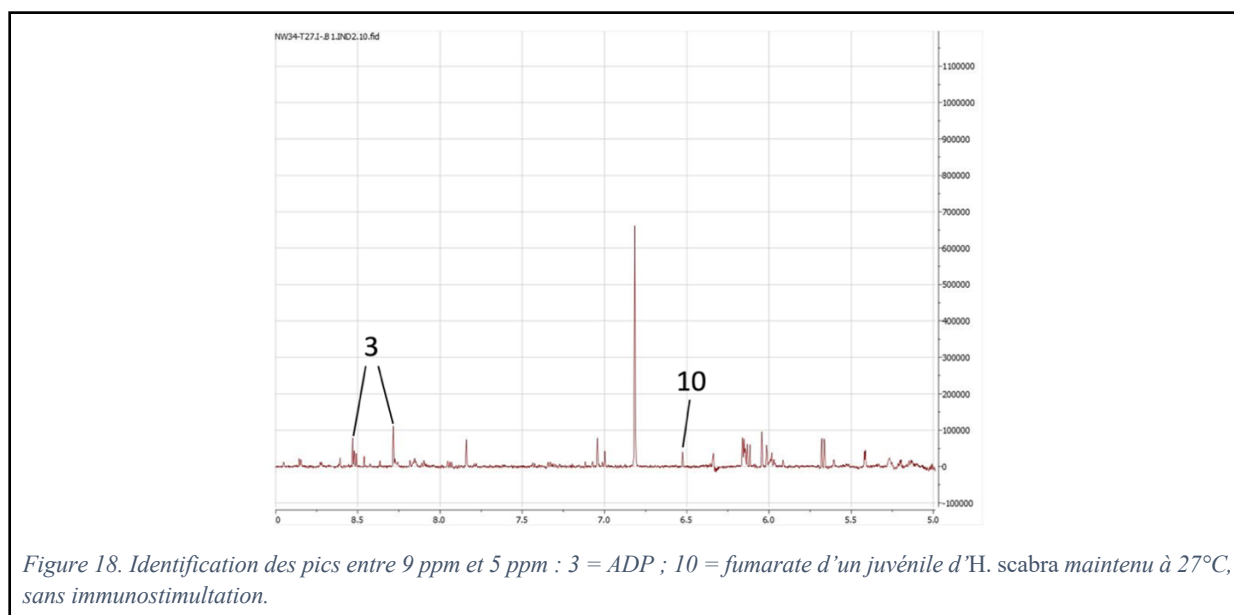


Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis révèle une différence statistiquement significative dans la vitesse moyenne entre les groupes de température testés seuls (p-valeur = 0,0021). Le test de Mann-Whitney avec un ajustement de Bonferroni montre une différence significative pour la vitesse moyenne entre le groupe contrôle et le groupe froid (p-valeur ajustée = 0,0455) mais non significative entre le groupe contrôle et le groupe chaud (p-valeur ajustée = 0,0779).

4. Approche métabonomique

4.1. Identification des métabolites

Les métabolites identifiés sont repris dans les *Figures 18* et *19* et sont reportés dans le *Tableau 3*.



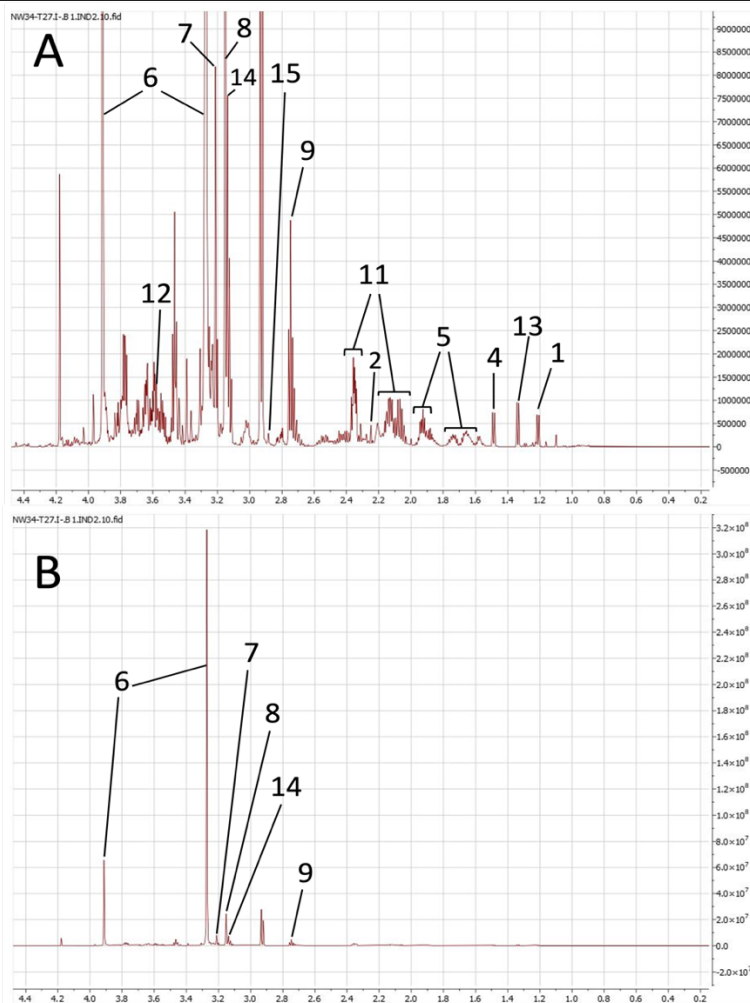


Figure 19. Identification des pics entre 4,4 ppm et 0,2 ppm d'un juvénile d'*H. scabra* maintenu à 27°C, sans immunostimulation. (A) Spectre zoomé : 1 = 5,6-dihydrothymine ; 2 = acétone ; 3 = ADP ; 4 = alanine ; 5 = arginine ; 6 = bétaïne ; 7 = choline ; 8 = diméthyl sulfone ; 9 = diméthylamine ; 11 = glutamate ; 12 = glycine ; 13 = lactate ; 14 = malonate ; 15 = triméthylamine. (B) Spectre dézoomé.

La Figure 20 illustre les différents spectres en fonction du tissu analysé. Les mêmes métabolites sont retrouvés dans le tégument et dans les muscles, mais leur concentration diffère. Les échantillons de canal du sable et de liquide cœlomique indiquent des concentrations faibles en métabolites. Le protocole devra probablement être adapté afin d'en extraire le maximum de composés.

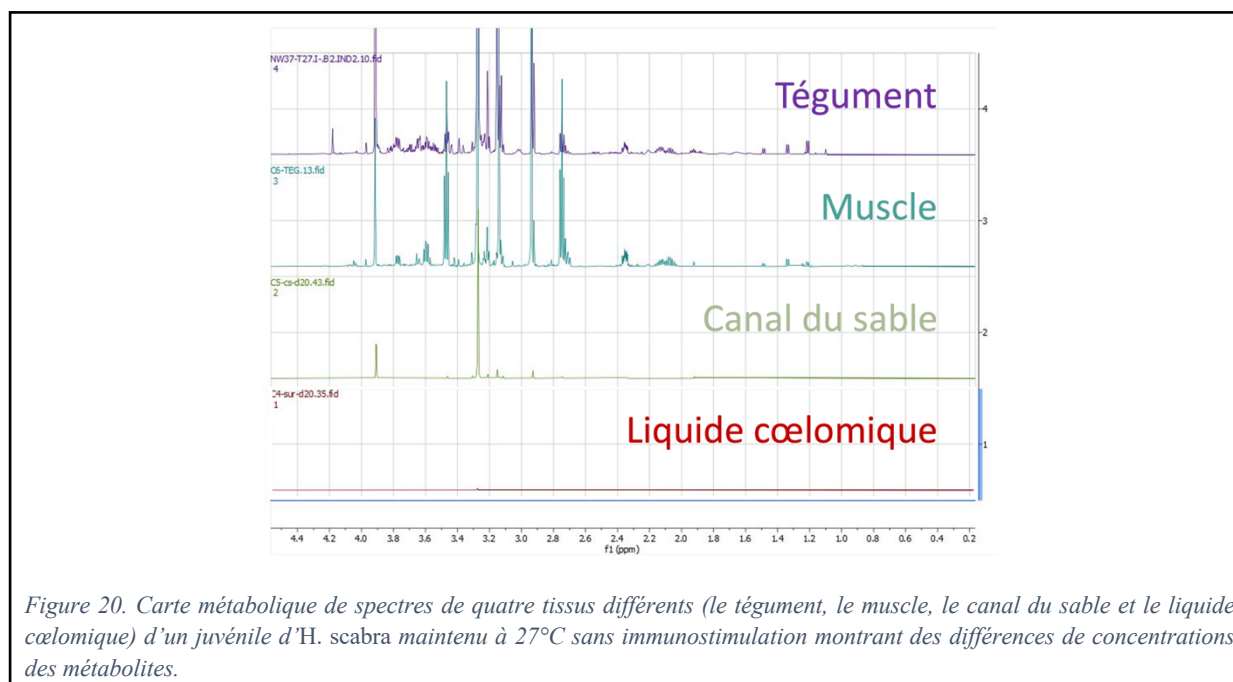


Figure 20. Carte métabolique de spectres de quatre tissus différents (le tégument, le muscle, le canal du sable et le liquide cœlomique) d'un juvénile d'*H. scabra* maintenu à 27°C sans immunostimulation montrant des différences de concentrations des métabolites.

Les métabolites « a », « b », « c », « d », « e », « f » du *Tableau 3* correspondent à des pics qui montrent une certaine variation entre les échantillons mais ils n'ont pas pu être identifiés.

*Tableau 3. Métabolites identifiés et abondance relative (calculée à partir de l'aire sous la courbe du pic, normalisée par l'aire totale) par ordre du déplacement chimique croissant (ppm) dans des échantillons de muscle d'*Holothuria scabra*.*

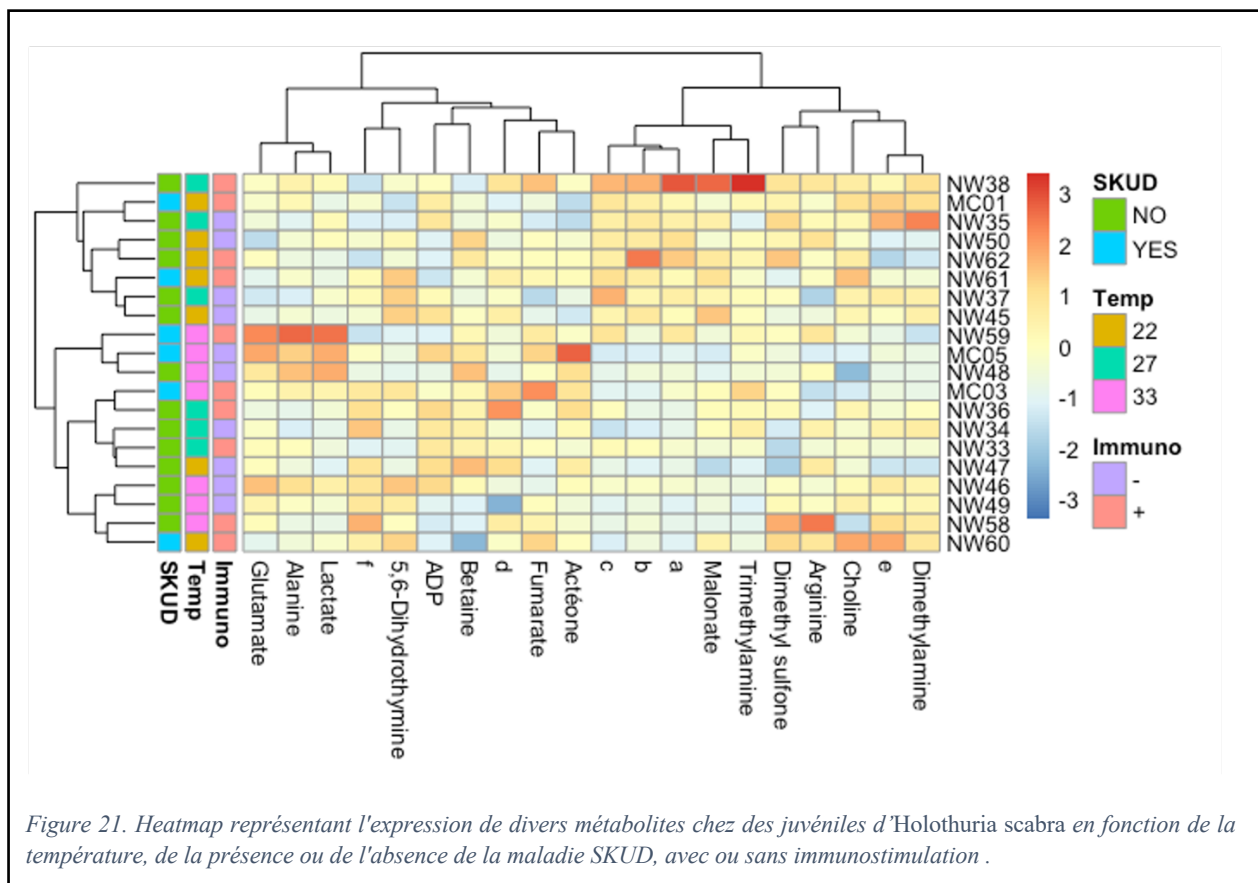
N°	Métabolites	Type de pic	Sous-régions (par 0,04 ppm)	Abondance relative ¹
1	a	Singulet	1,10	0,0439 %
2	b	Singulet	1,16	0,0143 %
3	5,6-Dihydrothymine	Doublet	1,21 ; 1,22	0,2134 %
4	c	Singulet	1,23	0,0142 %
5	Lactate	Doublet	1,33 ; 1,34	0,2662 %
6	Alanine	Doublet	1,48 ; 1,49	0,2171 %
7	d	Multiple	1,57 – 1,59	0,1287 %
8	Arginine	Multiple	1,63 – 1,69	0,3803 %
9	Acétone	Singulet	2,25	0,1128 %
10	Glutamate	Multiple	2,33 – 2,37	1,2982 %
11	Diméthylamine	Singulet	2,75	0,7462 %
12	Triméthylamine	Singulet	2,88	0,0592 %
13	e	Singulet	2,94	3,6630 %

¹ Certains métabolites identifiés présentent plusieurs pics dans les spectres. Le peak-picking a été effectué sur les pics les plus isolés et remarquables du métabolite. L'abondance relative donne donc une idée approximative du pourcentage de ce métabolite par rapport à l'ensemble du spectre.

14	Malonate	Singulet	3,14	1,8439 %
15	Diméthyl sulfone	Singulet	3,15	4,6463 %
16	Choline	Singulet	3,21	1,8223 %
17	Bétaïne	Singulet	3,91	10,1987 %
18	f	Singulet	4,18	0,7355 %
19	Fumarate	Singulet	6,53	0,0052 %
20	ADP	Doublet	8,53 ; 8,54	0,0280 %

4.2. Profil métabolique par individu

Les résultats de l'approche métabonomique montrent des regroupements basés sur l'expression des métabolites, influencés par des facteurs comme la température, le statut immunitaire et la présence de la maladie SKUD (*Figure 21*)².



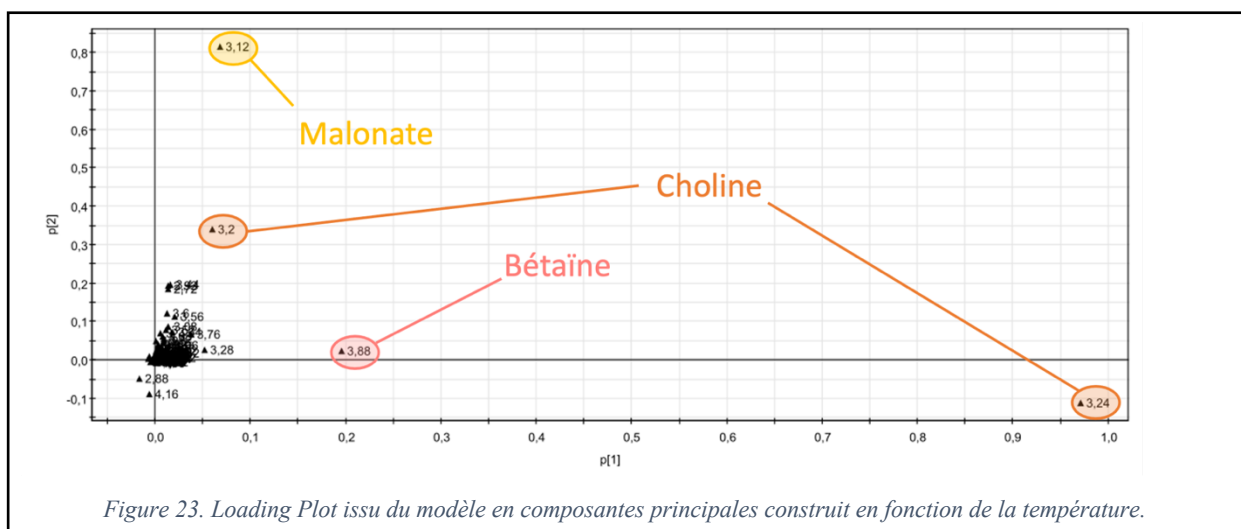
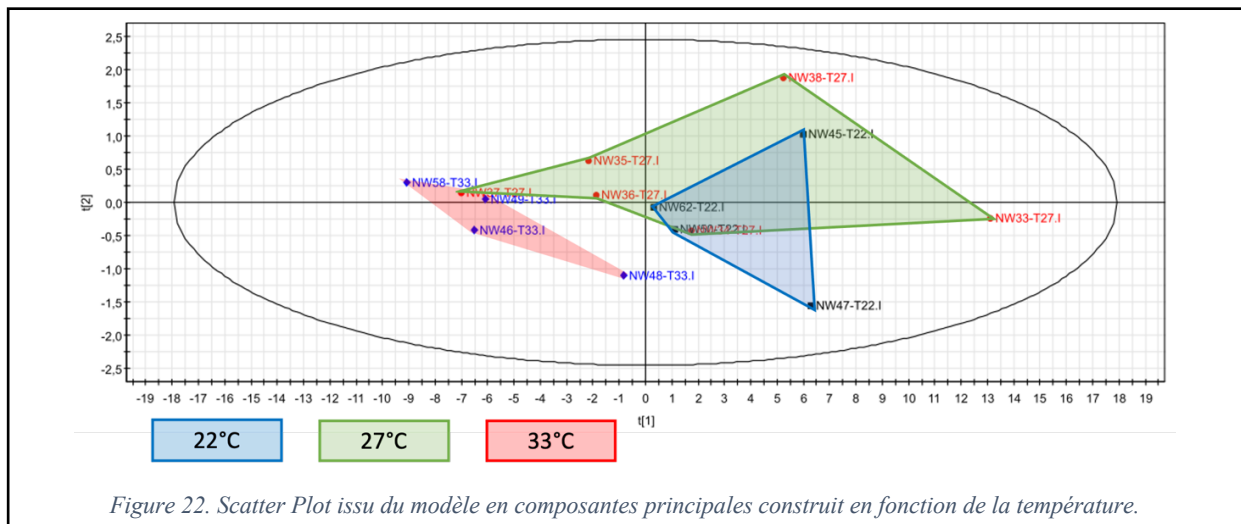
Les individus sont regroupés selon leurs profils métaboliques, indiquant des similarités dans les niveaux d'expression des métabolites. Le clustering hiérarchique révèle des groupes distincts d'individus qui partagent des caractéristiques métaboliques communes. Les métabolites sont également regroupés en fonction de leurs profils d'expression à travers les

² Sur la représentation Heatmap, la couleur traduit uniquement la variance entre les échantillons et non entre les métabolites.

différents individus. L'échelle de couleurs indique les niveaux relatifs d'expression des métabolites après normalisation. Les valeurs plus élevées sont représentées par le rouge, tandis que les valeurs plus faibles sont en bleu. Les trois températures (22°C, 27°C, 33°C) sont représentées, tout comme les deux conditions d'immunostimulation (+ et -) et les deux états concernant la SKUD (YES et NO).

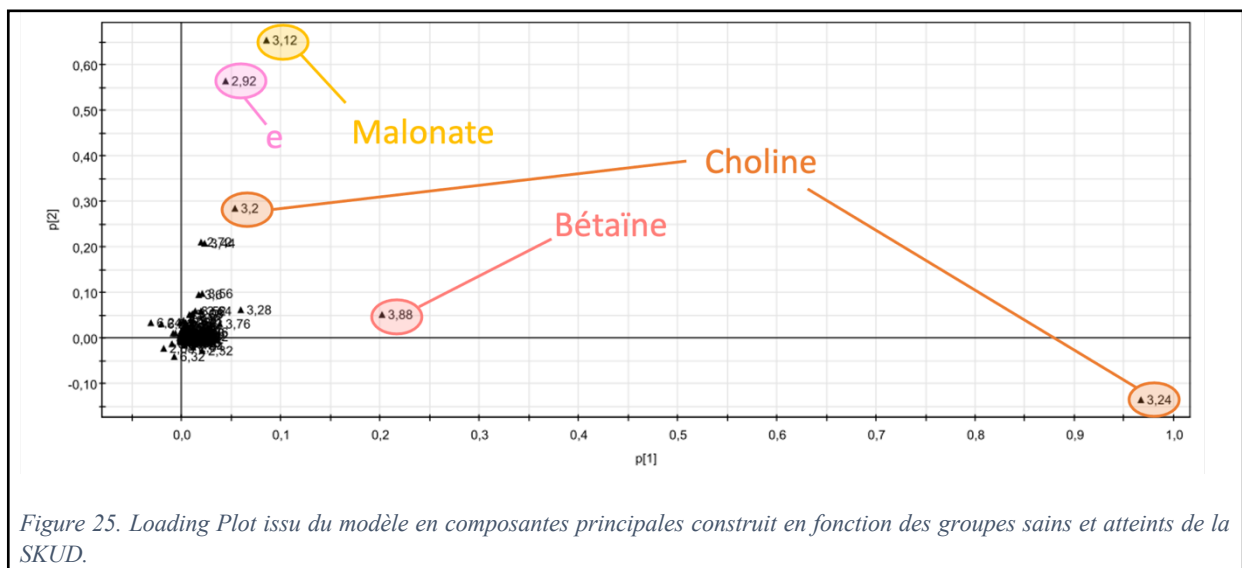
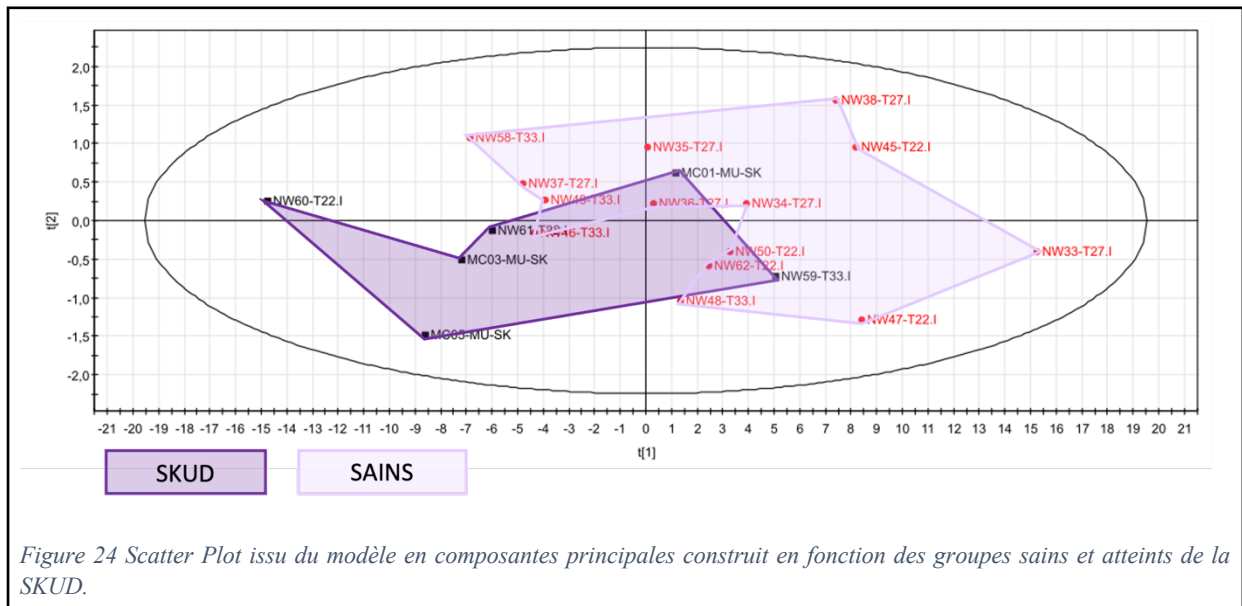
4.3. Analyse en composantes principales

Le Scatter Plot issu des modèles en composantes principales ci-dessous permet d'observer une légère séparation des groupes correspondant aux différentes températures (Figure 22). Sur le Loading Plot, les nombres correspondent aux sous-régions du spectre pour lesquelles le modèle trouve le plus de différences en fonction des groupes qui ont été indiqués (Figure 23). Les sous-régions qui séparent le plus les groupes correspondent dans l'ordre à la choline, au malonate et à la bêtaïne.

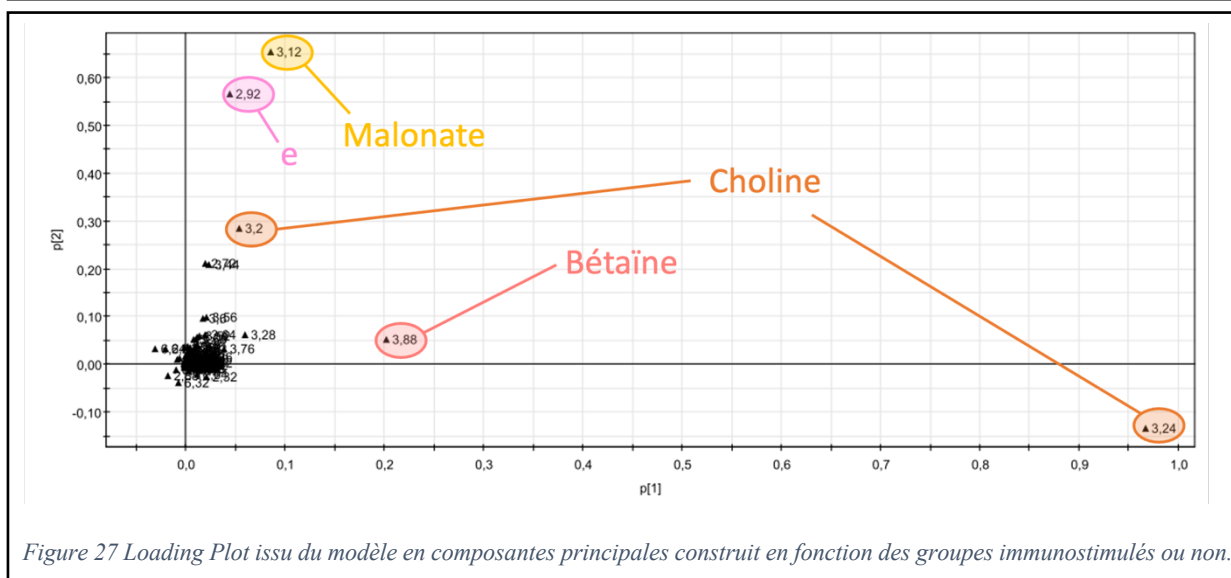
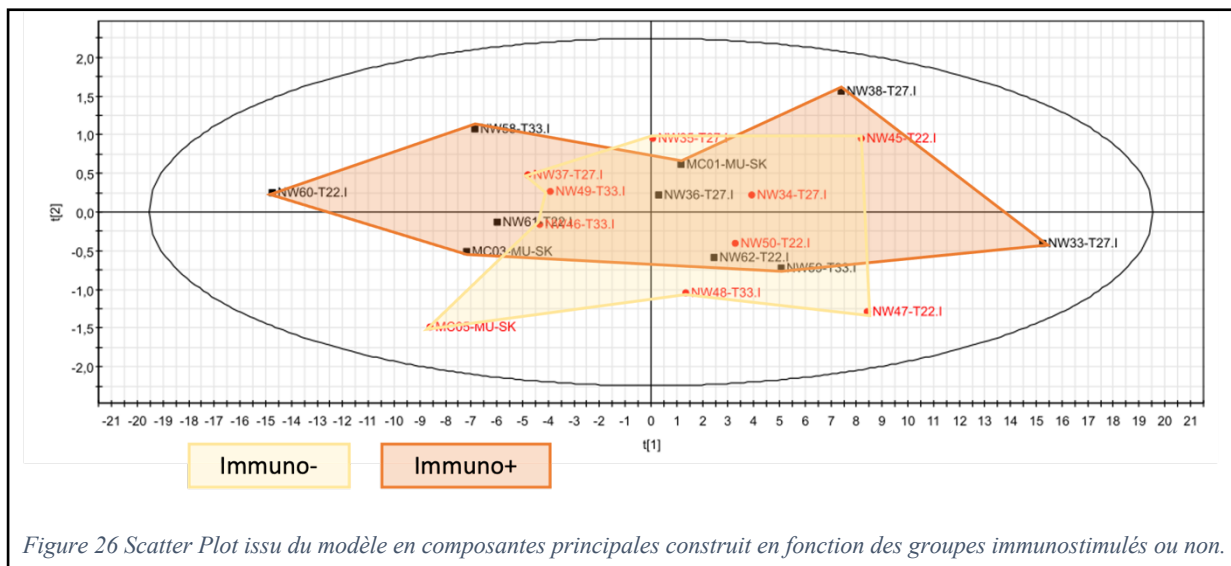


Le Scatter Plot issu des modèles en composantes principales ci-dessous permet d'observer une légère séparation du groupe des holothuries atteintes de la SKUD et du groupe

des holothuries saines (Figure 24). Sur le Loading Plot, les sous-régions qui séparent le plus les groupes correspondent dans l'ordre à la choline, au malonate, à la bêtaïne et au métabolite « e » (non identifié) (Figure 25).

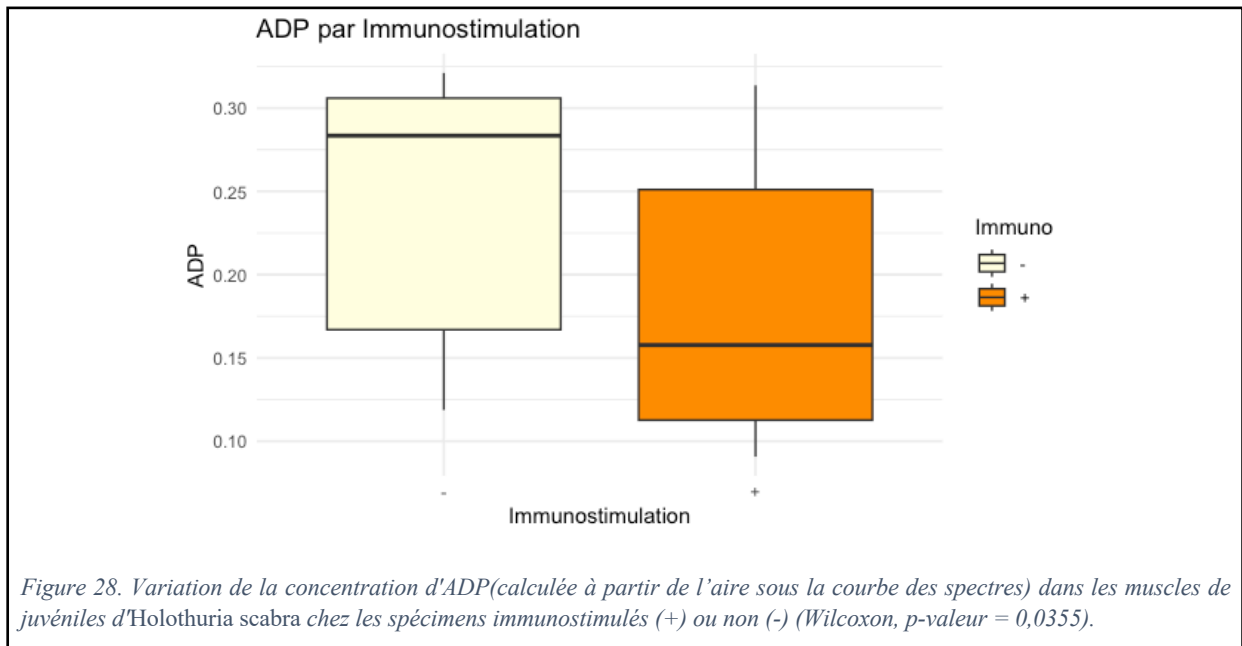


Le Scatter Plot issu des modèles en composantes principales ci-dessous ne permet pas d'observer une séparation entre le groupe des holothuries immunostimulées et celui qui ne l'est pas (Figure 26). Le Loading plot indique néanmoins les sous-régions qui séparent le plus le modèle en fonction des groupes choisis. Les métabolites correspondant sont : la choline, le malonate, la bêtaïne et le métabolite « e » (non identifié) (Figure 27).

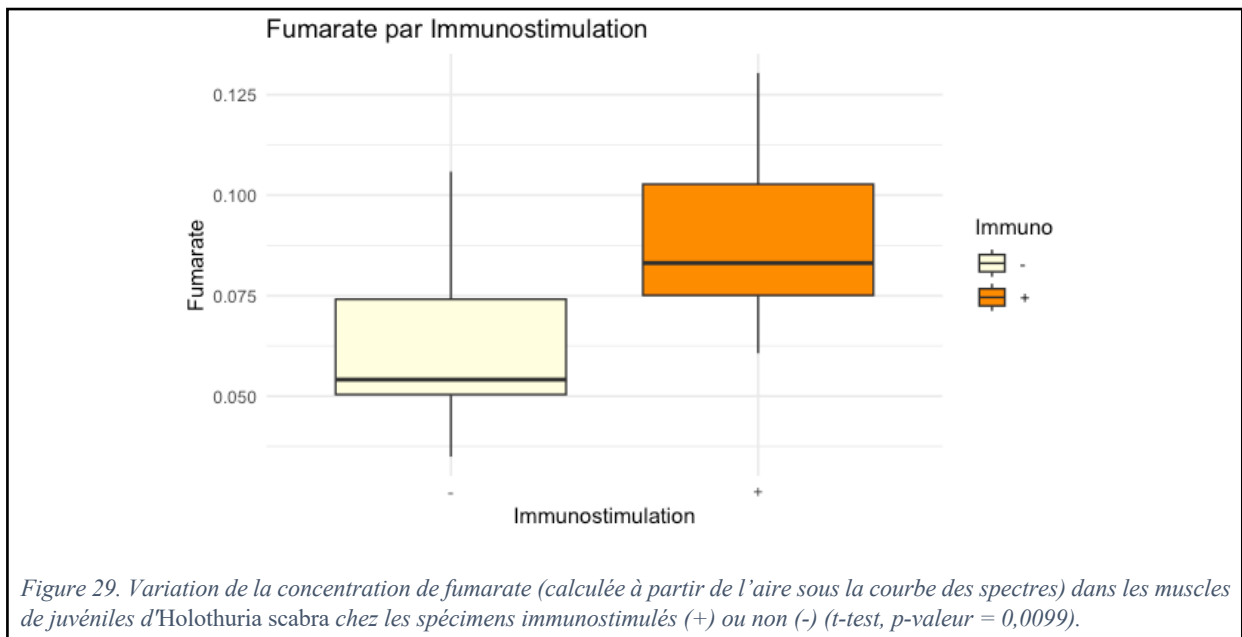


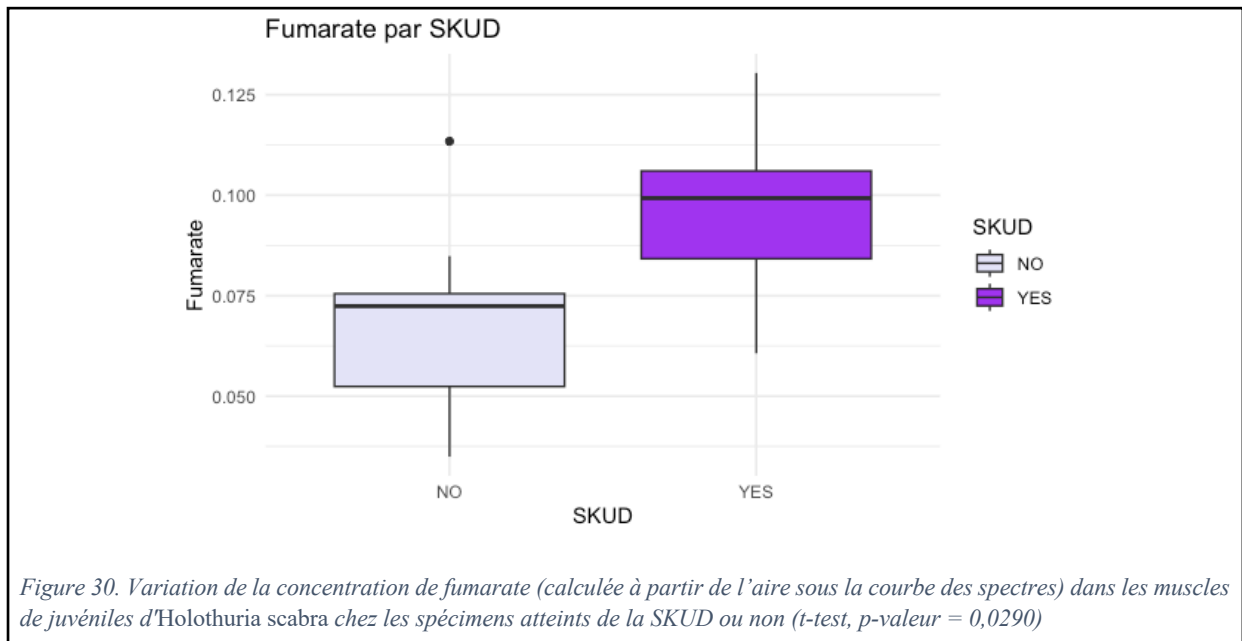
4.4. Analyses statistiques de chaque métabolite

Les deux conditions (température, immunostimulation) ont été testées sur tous les métabolites identifiés précédemment dans les échantillons de muscles d'*H. scabra*. L'atteinte de la SKUD ou non a également été testée comme facteur pouvant impacter la concentration en métabolites. Seuls les métabolites ayant révélé des variations significatives en réponse aux conditions expérimentales (température, immunostimulation et présence ou non de la SKUD) ont été repris dans la suite. Parmi les métabolites analysés, l'ADP a montré une variation significative en réponse à l'immunostimulation (Wilcoxon, p-valeur = 0,0355) (Figure 28).

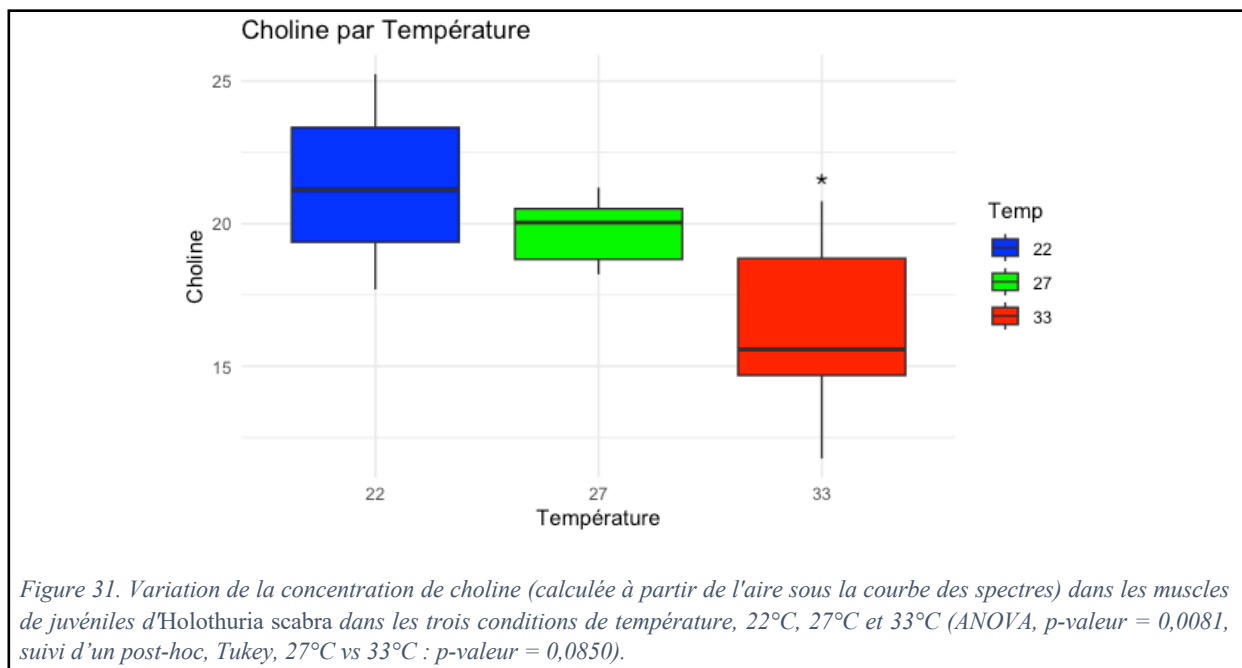


Le fumarate a également montré des variations significatives à la fois en réponse à l'immunostimulation (t-test, p-valeur = 0,0099) ainsi qu'à la présence de la SKUD (t-test, p-valeur = 0,0290) (Figures 29 et 30).

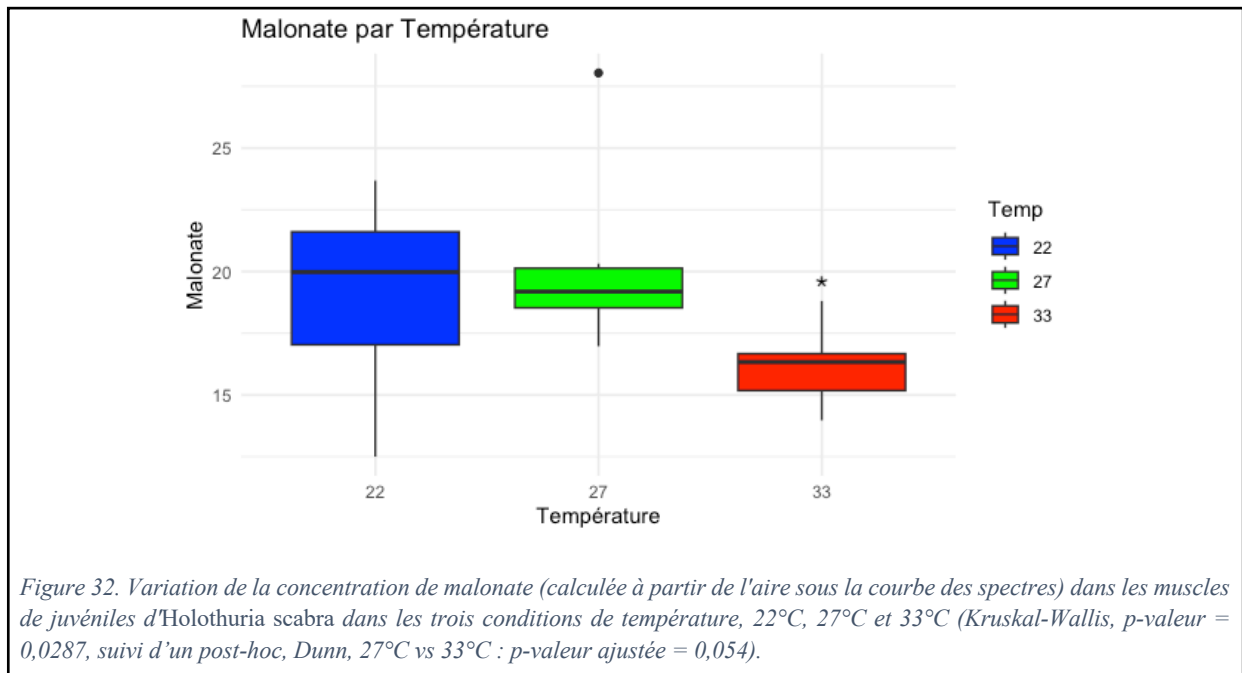




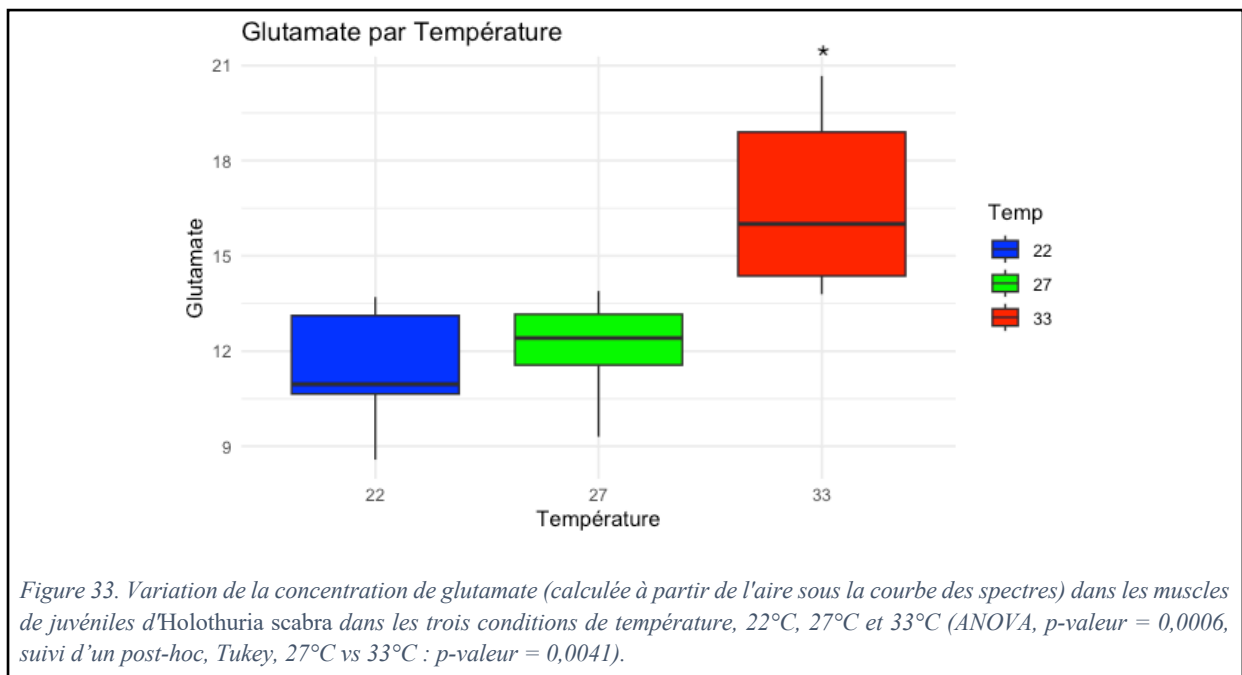
Les tests statistiques ont également mis en évidence une influence significative de la température sur les niveaux de plusieurs métabolites. Ainsi, la choline a montré une variation significative en fonction de la température (ANOVA, p-valeur = 0,0081), avec des différences post-hoc significatives entre les groupes 27°C et 33°C (Tukey, p-valeur = 0,0850) (Figure 31).



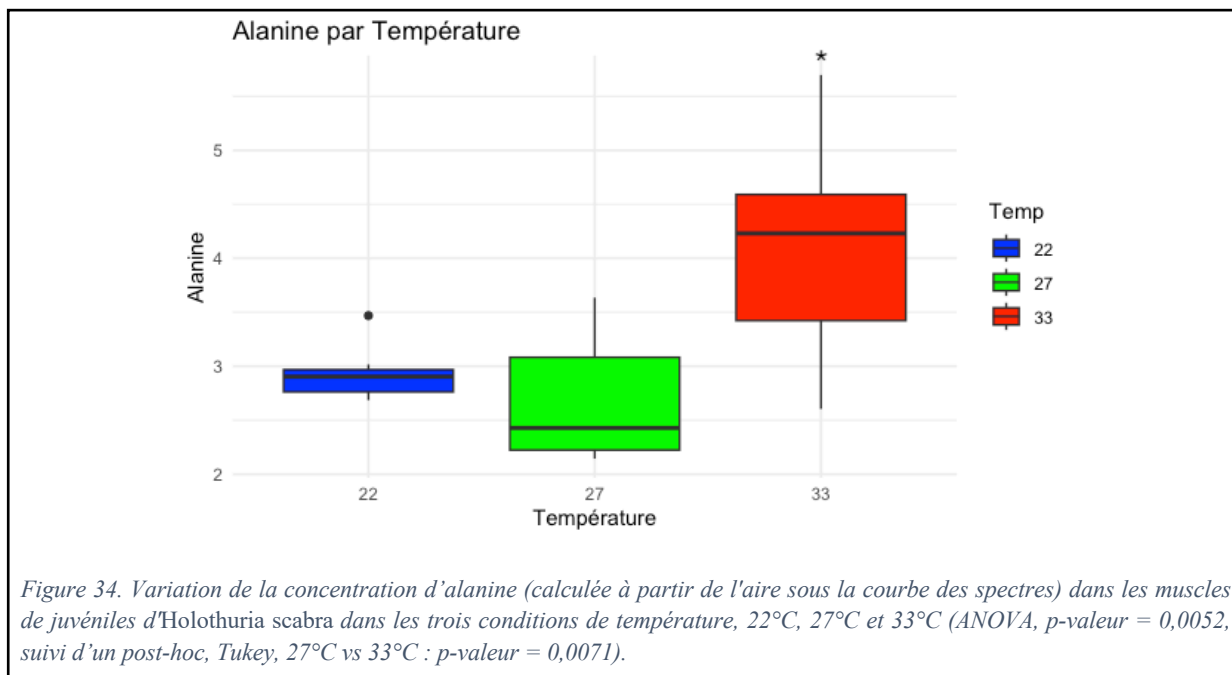
De même, le malonate a été influencé par la température (Kruskal-Wallis, p-valeur = 0,0287), avec une tendance significative identifiée entre les groupes 27°C et 33°C (Dunn, p-valeur ajustée = 0,054) (Figure 32).



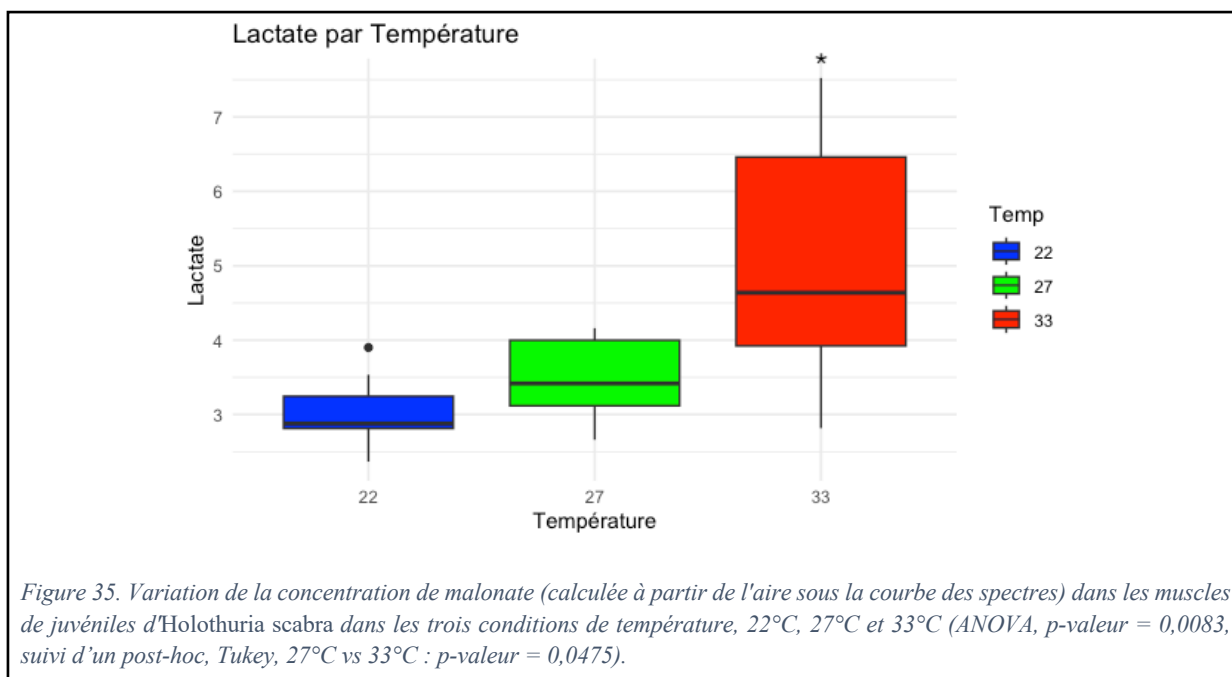
Le glutamate a également présenté une variation significative en fonction de la température (ANOVA, p-valeur = 0,0006), avec des différences post hoc significatives entre les groupes 27°C et 33°C (Tukey, p-valeur = 0,0041) (Figure 33).



Les niveaux d'alanine ont également été significativement influencés par la température (ANOVA, p-valeur = 0,0052), avec des différences post hoc entre les groupes 27°C et 33°C (Tukey, p-valeur = 0,0071) (Figure 34).



Enfin, le lactate a montré une variation significative en réponse à la température (ANOVA, p-valeur = 0,0083), avec des différences post hoc observées entre les groupes 27°C et 33°C (Tukey, p-valeur = 0,0475) (Figure 35).



DISCUSSION

1. Impact de la température et de l'immunostimulation sur la perte de masse chez *Holothuria scabra*

Une perte de masse significative a été observée pour tous les individus suivis durant notre expérience. En toutes hypothèses, cette perte de masse est liée à une densité de population plus importante dans nos conditions expérimentales. En condition d'aquaculture, la densité optimale de juvéniles est de l'ordre de 1 individu par m² (Hamel et al. 2022). Or, dans notre design expérimental, les holothuries disposent d'environ 200 cm² par individu, ce qui représente une densité de population 50 fois plus importante. Lorsque les individus sont mis en conditions, la densité de population diminue légèrement dans les bassines (34,9 holothuries/m²) et est divisée par deux après la première phase de prélèvement/dissection (17,4 holothuries/m²). Il est connu qu'une densité trop importante peut affecter négativement la croissance d' *H. scabra*, et ce, déjà à partir de 6,2 individus par m² (Asha et Diwakar, 2013, Lavitra et al., 2010). D'autres études indiquent également un ralentissement voire un arrêt de la croissance à partir de 150 à 300 g/m² (Pitt et Nguyen, 2004, Battaglione et al. 1999). Sachant que les holothuries ont une masse fraîche moyenne de 26,8 ± 6,0 g à leur arrivée, la densité de population utilisée lors de l'expérience est largement au-dessus de ce seuil (Claereboudt et al. 2023).

L'équipe de recherche est néanmoins consciente de cette relativement haute densité qui est imposée par les limitations logistiques du terrain. Des pertes de masses ont déjà pu être observées lors d'expériences précédentes du laboratoire mais aussi au sein de conditions d'aquacultures suboptimales (observations personnelles, Noé Wambreuse, Jérôme Delroisse). Bien que ces conditions expérimentales soient non-optimales, il apparaît clair que ce stress potentiel est distribué de manière homogène au sein de toutes les conditions, en ce compris les contrôles. Les différences observées entre les conditions expérimentales, bien que potentiellement influencées par cette perte de masse, doivent être principalement attribuées à nos conditions expérimentales contrastées.

2. Impact de la température et de l'immunostimulation sur l'émergence de la SKUD chez *Holothuria scabra*

En ce qui concerne l'émergence de la maladie SKUD, plusieurs éléments sont à considérer. Tout d'abord, la densité des individus dans nos dispositifs expérimentaux pourrait avoir un effet sur l'émergence de la SKUD comme c'est le cas pour l'espèce tempérée *A.*

japonicus (Zhang & Liu, 1998). Il est donc nécessaire de garder cela en tête lors de l'analyse de l'impact de la température sur l'émergence de la SKUD. Néanmoins, l'absence de cas de SKUD dans le groupe contrôle (27°C, sans immunostimulation) suggère que la densité pourrait ne pas influencer l'émergence de la SKUD lorsque la température de l'eau est optimale. Il est à noter que certains cas de SKUD ont été observés dans les bassins d'acclimatation. Cette observation pourrait être attribuée au stress du transport. En accord avec l'étude de Delroisse et al. (2020), l'impact de l'exposition au froid sur l'occurrence de la maladie semble avéré et l'augmentation des cas tout au long de l'expérience appuie cette constatation (Delroisse et al., 2020).

Bien que le traitement chaud ait également montré une occurrence de la maladie significativement plus importante que dans le groupe contrôle, de nouveaux cas de SKUD ne sont plus apparus dans la deuxième moitié de l'expérience.

Selon l'étude de Kamyhab et al. (2017), un stress lié à une augmentation de la température (33°C) entraîne une augmentation de l'activité des enzymes liées au système immunitaire, telles que la phénoloxydase. Cette enzyme est responsable du processus immunitaire de mélanisation qui implique notamment la production de molécules ayant un pouvoir oxydatif élevé (Söderhäll et Cerenius, 1998). En parallèle, l'étude révèle une augmentation des niveaux des radicaux superoxydes. Cependant, les dommages oxydatifs associés sont limités par des enzymes antioxydantes, comme la superoxyde dismutase (Kamyhab et al. 2017). Dans cette même étude, les spécimens d'*H. scabra* ayant subi un stress maximal immédiatement après avoir été mis en conditions semblent s'acclimater après 15 jours (Kamyhab et al. 2017). L'augmentation de la température affaiblit vraisemblablement le système immunitaire d'*H. scabra*. Néanmoins, le stress thermique modéré que représente une température de 33°C permet probablement aux individus de s'adapter en une douzaine de jours. Un stress thermique plus important (41°C) entraîne une diminution de la consommation d'oxygène, une perturbation homéostatique aiguë et un stress thermique mortel (Kühnhold et al., 2019).

Le dernier facteur suspecté d'induire la SKUD est l'injection d'eau de mer non-stérile (condition « immunostimulation » dans notre étude). La comparaison par groupe permet d'identifier les groupes froids, avec et sans immunostimulation, et le groupe chaud avec immunostimulation comme étant chacun significativement différents du groupe contrôle. Comme énoncé plus haut, le traitement à basse température favorise déjà à lui seul l'induction de la SKUD. Il n'est donc pas étonnant que les deux groupes, immunostimulés ou non, montrent

une occurrence de la maladie supérieure à celle du groupe contrôle. Le résultat obtenu pour le traitement chaud suggère que l'occurrence de la SKUD augmente par rapport au groupe contrôle lorsque les individus ont été injectés à l'eau de mer contenant un nombre important de bactéries. Contrairement à l'espèce *A. japonicus* pour laquelle la bactérie *Vibrio splendidus* est clairement identifiée comme pathogène, chez *H. scabra*, le lien entre l'émergence de la SKUD et la présence de bactéries spécifiques, dont certaines du genre *Vibrio*, n'a pas pu être démontré (Li et al. 2010, Zhao et al. 2011 et 2012, Deng et al., 2008). Dans un futur proche, il est prévu d'identifier les bactéries présentes dans l'eau de mer non-stérile à l'aide d'analyses de métagénomique ciblée (séquençage 16S), ce qui pourrait, en tous cas, permettre la mise en évidence d'agents pathogènes potentiels. L'injection d'eau de mer pourrait en tous cas affaiblir le système immunitaire et ainsi favoriser l'émergence de la maladie dans des conditions défavorables de température (effet synergique).

3. Impact de la température et de l'immunostimulation sur le comportement de *Holothuria scabra*

La mobilité d'*H. scabra* varie selon les différentes conditions testées et la température a été identifiée comme étant le facteur déterminant. Pour le déplacement cumulé, l'absence d'effet de l'immunostimulation et de l'interaction entre l'immunostimulation et la température, telle qu'indiquée par les tests statistiques, permet d'attribuer la variation du déplacement uniquement au facteur température. Cette absence d'effet de l'immunostimulation est confirmée lorsque l'on considère les variables indépendamment les unes des autres afin d'obtenir une analyse statistique plus robuste. En effet, aucune différence significative n'est observée pour la variable immunostimulation (n=9) alors qu'une différence significative est bien observée pour la variable température (n=6). Toutefois, dans le cadre d'une étude avec un échantillonnage plus large, il serait préférable de ne pas regrouper les conditions d'immunostimulation et de température, afin de minimiser la variance intra-groupe, bien qu'un échantillonnage plus important (par exemple n=9 pour la comparaison immunostimulation-contrôle) réduise l'effet d'une variance importante sur le résultat du test statistique.

En ce qui concerne la vitesse moyenne, le test statistique révèle une tendance dans laquelle l'interaction entre l'immunostimulation et la température semble avoir un effet significatif sur la vitesse moyenne. Même si cette interaction ne peut pas être ignorée, elle doit être interprétée avec prudence en raison de la taille réduite de l'échantillon (n=3). De plus, l'absence d'effet significatif de l'immunostimulation, associée à un effet significatif de la température lorsque les deux variables sont testées indépendamment, suggère que

l'immunostimulation n'a pas un impact suffisamment fort pour être détecté et que la variabilité observée est principalement attribuable à la température. Bien que l'interaction puisse exister, il est nécessaire d'augmenter la taille de l'échantillon pour confirmer cette interaction de manière plus rigoureuse.

En couplant les conditions d'immunostimulation par température (afin d'obtenir un effectif suffisant pour réaliser une interprétation fiable du test statistique), le déplacement cumulé ainsi que la vitesse moyenne des holothuries se montrent impactés par la température. Lorsque la température est plus importante, le déplacement cumulé des individus est significativement plus grand car les organismes ont probablement plus tendance à rester à la surface du sédiment. De manière générale, les températures plus élevées favorisent l'activité et le métabolisme chez les échinodermes (Gooding et al., 2009). C'est le cas dans l'étude de Mercier et al., (2000) qui observent les déplacements diurnes de *H. scabra*, étude dans laquelle les individus restent en surface lorsque la température de l'eau est entre 30°C et 34°C tandis qu'il s'enfouissent lorsque la température baisse en dessous de 28-29°C (Mercier et al., 2000). Une autre étude sur *H. scabra* montre une activité accrue de déplacement à 33°C, qui pourrait être expliquée par une réponse adaptative pour augmenter la recherche de nourriture ou afin d'éviter un environnement trop chaud (Mercier et al., 1999). Au contraire, lorsque la température est faible, les juvéniles cherchent à s'abriter dans le sédiment et s'enfouissent, diminuant ainsi leur déplacement. Ce comportement a également été observé dans la présente étude, et c'est ce que confirment les études de Purcell (2010) et Mercier et al. (1999) qui ont lié l'enfouissement des spécimens d'*H. scabra* adultes, subadultes (Purcell, 2010) et juvéniles (Mercier et al., 1999) à la température froide de l'eau. L'augmentation de la durée d'enfouissement semble leur permettre de conserver l'énergie et minimiser l'exposition à des conditions moins favorables (Mercier et al., 1999). Enfin, à faible température, la diminution du déplacement et de la vitesse moyenne peut également être liée à une réduction très importante du métabolisme accompagnée d'un faible taux de respiration (Kühnhold et al, 2019, Mercier et al., 1999). Par ailleurs, contrairement au déplacement cumulé plus important, la vitesse moyenne à température chaude n'est pas significativement plus grande qu'à la température de contrôle. Cela pourrait suggérer que les mouvements des juvéniles sont moins efficaces (déplacement cumulé plus important pour une vitesse moyenne plus faible). Cependant, le test ne s'est peut-être pas révélé significatif en raison d'un effectif encore trop faible ($n = 6$) puisqu'une tendance se dessine tout de même sur le graphique, ces résultats ne nous permettent donc pas une interprétation catégorique.

4. Impact de la température et de l'immunostimulation sur le métabolisme de *Holothuria scabra*

Les analyses en composantes ont pu montrer que certains métabolites sont caractérisés par des abondances contrastées entre les traitements. Les abondances de la plupart des métabolites d'intérêt, préalablement identifiés par les analyses en composantes principales, se sont révélées significativement différentes entre nos conditions expérimentales.

Certains acides aminés libres comme le glutamate et l'alanine voient leur taux augmenter dans les conditions chaudes. Les acides aminés libres peuvent être convertis en d'autres acides aminés ou en glucose mais peuvent également être utilisés comme source d'énergie par le système immunitaire ou le métabolisme énergétique (Shao et al., 2015). Une concentration importante en acides aminés pourrait donc correspondre à une réponse précoce de l'organisme face à une demande énergétique plus importante due aux conditions de température. Chez les invertébrés marins, l'équilibre de l'osmolarité intracellulaire et l'adaptation du métabolisme énergétique induisent des taux importants d'acides aminés (Viant et al., 2003). Ainsi, les concentrations importantes en acides aminés peuvent correspondre à une perturbation de la régulation osmotique (Shao et al., 2015). De plus, l'augmentation du glutamate et de l'alanine sous des températures élevées pourrait indiquer une activation accrue du cycle de l'acide tricarboxylique pour répondre à une demande énergétique plus élevée (*Figure 37*).

Le taux de malonate, qui est un inhibiteur compétitif de la respiration cellulaire, augmente aussi de manière significative lorsque la température est plus importante. Ce métabolite agit comme inhibiteur en se fixant sur le site actif de la succinate déshydrogénase dans le cycle de l'acide tricarboxylique, ce qui empêche la conversion du succinate en fumarate (Zhang et al., 2011). Dans l'étude de Chen et al. (2018), un hydrocarbure nocif induit, chez l'huître perlière *Pinctada martensii*, une diminution du taux de malonate et cela se traduit par une perturbation du cycle de l'acide tricarboxylique. Une augmentation de la quantité de malonate dans le groupe des individus soumis à une température importante pourrait également indiquer un dysfonctionnement dans le métabolisme énergétique (*Figure 36*).

Par ailleurs, les taux de fumarate augmentent lorsque les individus sont atteints de la SKUD et chez les individus immunostimulés. Cela indique que le métabolisme énergétique est perturbé dans ces deux conditions car le fumarate est un intermédiaire du cycle de l'acide tricarboxylique utilisé par les cellules pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (Shao et

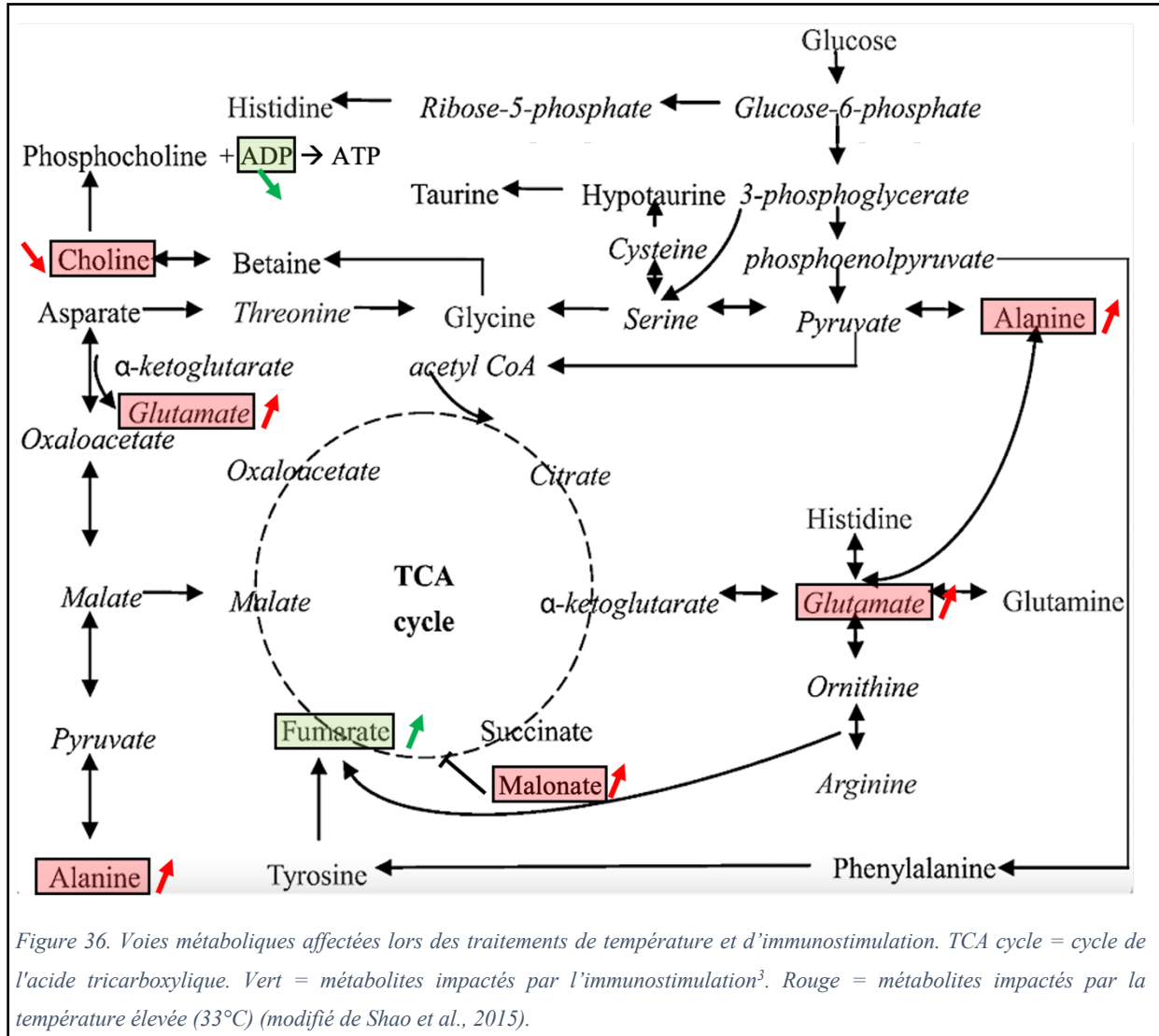
al., 2015) (*Figure 36*). Bien que l'augmentation de ce métabolite chez l'espèce *A. japonicus* indique également une perturbation du métabolisme énergétique, les conditions de l'augmentation du fumarate sont différentes car c'est l'augmentation de la température qui l'induit chez l'espèce asiatique et pas une forme d'immunostimulation ou encore l'atteinte d'une maladie (Shao et al., 2015).

La concentration en choline est significativement plus faible dans les températures chaudes. La choline est un précurseur de la bétaine qui est un osmolyte important chez les invertébrés marins (Robertson, 1980, Lever et Slow, 2010, Shao et al., 2015). La bétaine est présente en très grande quantité dans tous les échantillons de muscles testés, ce qui souligne son importance dans la physiologie des holothuries. La choline joue également un rôle dans la réaction de conversion de l'ATP en phosphocholine et en ADP, catalysée par la choline kinase (Shao et al., 2015). Une concentration importante en phosphocholine a été liée à une diminution de la demande énergétique (Liu et al. 2014). Lors de l'identification des métabolites, la phosphocholine n'a pas pu être identifiée, ce qui ne permet pas d'avoir une idée de la variation de sa concentration selon les différentes conditions. Néanmoins, la diminution des taux de choline pourrait traduire une perturbation de la membrane cellulaire ou un ajustement osmotique en réponse au stress thermique. Les holothuries pourraient dégrader la choline dans le but de produire d'autres osmolytes ou pour soutenir des voies métaboliques alternatives nécessaires en situation de stress thermique (*Figure 36*).

Une diminution de l'ADP a été observée chez les individus immunostimulés. Cette réponse pourrait provenir d'une augmentation de la demande énergétique car l'ADP est impliquée dans plusieurs mécanismes menant à la formation d'ATP (Klingenberg, 2008). À nouveau, le manque d'information concernant les taux de phosphocholine ne permet pas de lier cette diminution au mécanisme de conversion de l'ATP qui implique l'ADP et la phosphocholine. De plus, l'ATP n'a pas pu être identifié comme un métabolite présent dans les échantillons de muscles. Il se pourrait donc que la diminution du taux d'ADP provienne de sa conversion en ATP, dont les stocks sont utilisés par une demande énergétique accrue en raison de l'immunostimulation.

Enfin, le lactate, dont le taux augmente en condition chaude, est un produit final de la glycolyse anaérobie. Lorsque certains organismes marins sont privés d'oxygène, leur production de lactate augmente afin de réduire les tensions en oxygène (Ross Ellington et Hammen, 1977). C'est le cas pour l'espèce d'holothurie *Sclerodactyla briareus* dans l'étude de Ross Ellington et Hammen (1977). Bien que dans la présente étude le stress thermique ne soit

pas critique, l'augmentation du taux de lactate pourrait être une conséquence directe de la saturation des capacités mitochondriales sous stress thermique, ce qui forcerait l'organisme à utiliser des voies métaboliques alternatives pour répondre à ses besoins énergétiques (Kühnhold et al., 2019).



³ Les taux fumarate sont également augmentés dans le groupe des organismes qui sont atteints de la SKUD.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis de mettre en évidence l'impact significatif des variations de température et du stress immunologique sur la santé de juvéniles d'*Holothuria scabra*. Les résultats montrent que les températures extrêmes, tant basses (22°C) que hautes (33°C), favorisent le développement de la SKUD. À 22°C, la SKUD s'est développée de manière continue tout au long de l'expérience, tandis qu'à 33°C, la maladie est apparue principalement dans la première moitié de l'étude, avant qu'une forme d'acclimatation se manifeste. Les analyses métabonomiques ont révélé des altérations dans les profils métaboliques, notamment une augmentation des concentrations de certains acides aminés comme le glutamate et l'alanine, ainsi que des variations dans les niveaux d'ADP, de fumarate, de malonate, de choline, et de lactate sous stress thermique et immunologique. Ces changements suggèrent une perturbation de l'homéostasie et du métabolisme énergétique en réponse aux conditions de stress.

Cependant, certaines questions restent en suspens. Par exemple, l'adaptation observée chez les individus soumis à une température de 33°C après une période initiale de stress soulève des interrogations sur les mécanismes d'acclimatation et leurs limites. De plus, cette acclimatation pourrait faire l'objet d'une étude métabonomique plus approfondie des échantillons collectés en fin d'expérience. Les comptages des cœlomocytes pourraient également fournir des informations pertinentes sur l'impact de l'immunostimulation et de la température sur le nombre de cellules immunitaires.

Il est important de noter qu'aucune étude métabonomique couplée à des analyses RMN n'a été réalisée auparavant sur *Holothuria scabra*, les connaissances actuelles étant principalement basées sur l'espèce asiatique *Apostichopus japonicus*. Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude fournissent une première base comparative, ouvrant la voie à des analyses plus approfondies et à la comparaison des réponses métaboliques entre ces deux espèces d'holothuries économiquement importantes.

Pour aller plus loin, les études futures de l'équipe de recherche pourraient se concentrer sur l'identification précise des voies métaboliques affectées par ces stress et sur la compréhension des mécanismes moléculaires qui permettent aux holothuries de s'adapter ou non à ces conditions extrêmes.

ANNEXES

Annexe 1 : déroulement des activités à Madagascar

Tableau 4. Résumé des activités réalisées à l'IH.SM (Madagascar) durant la mission de terrain de mars-avril 2024. « P » désigne les jours de pesées.

Date	Jour	Général	R1	R2
28-mars	Jeudi	Acclimatation R1-R2	Préparation	Préparation
29-mars	Vendredi	Acclimatation R1-R2	Acclimatation	Acclimatation
30-mars	Samedi	Acclimatation R1-R2	Acclimatation	Acclimatation
31-mars	Dimanche	Acclimatation R1-R2	Acclimatation	Acclimatation
1-avr.	Lundi	Acclimatation R1-R2	Acclimatation	Acclimatation
2-avr.	Mardi	Acclimatation R2	Bassine (P1)	Acclimatation
3-avr.	Mercredi	Acclimatation R2	vidéo 0	Acclimatation
4-avr.	Jeudi		Injection	Bassine (P1)
5-avr.	Vendredi		Dissection (P2)	vidéo 0
6-avr.	Samedi		vidéo 1	Injection
7-avr.	Dimanche		Bassine	Dissection (P2)
8-avr.	Lundi		Bassine	vidéo 1
9-avr.	Mardi		Bassine	Bassine
10-avr.	Mercredi		vidéo 5	Bassine
11-avr.	Jeudi		Bassine	Bassine
12-avr.	Vendredi		Bassine (P3)	vidéo 5
13-avr.	Samedi		Bassine	Bassine
14-avr.	Dimanche		Bassine	Bassine (P3)
15-avr.	Lundi		vidéo 10	Bassine
16-avr.	Mardi		Bassine	Bassine
17-avr.	Mercredi		Bassine	vidéo 10
18-avr.	Jeudi		Bassine	Bassine
19-avr.	Vendredi		vidéo 15	Bassine
20-avr.	Samedi		Bassine	Bassine
21-avr.	Dimanche		Bassine	vidéo 15
22-avr.	Lundi		Injection	Bassine
23-avr.	Mardi		Dissection (P4)	Injection
24-avr.	Mercredi		Rangement	Dissection (P4)
25-avr.	Jeudi		Rangement	Rangement
26-avr.	Vendredi		Rangement	Rangement
27-avr.	Samedi		Départ	Départ

Annexe 2 : exemples de tracking d'holothuries

Les Figures 38 A, B et C montrent le déplacement d'un juvénile d'*H. scabra* dans les conditions de températures : 22°C, 27°C et 33°C.

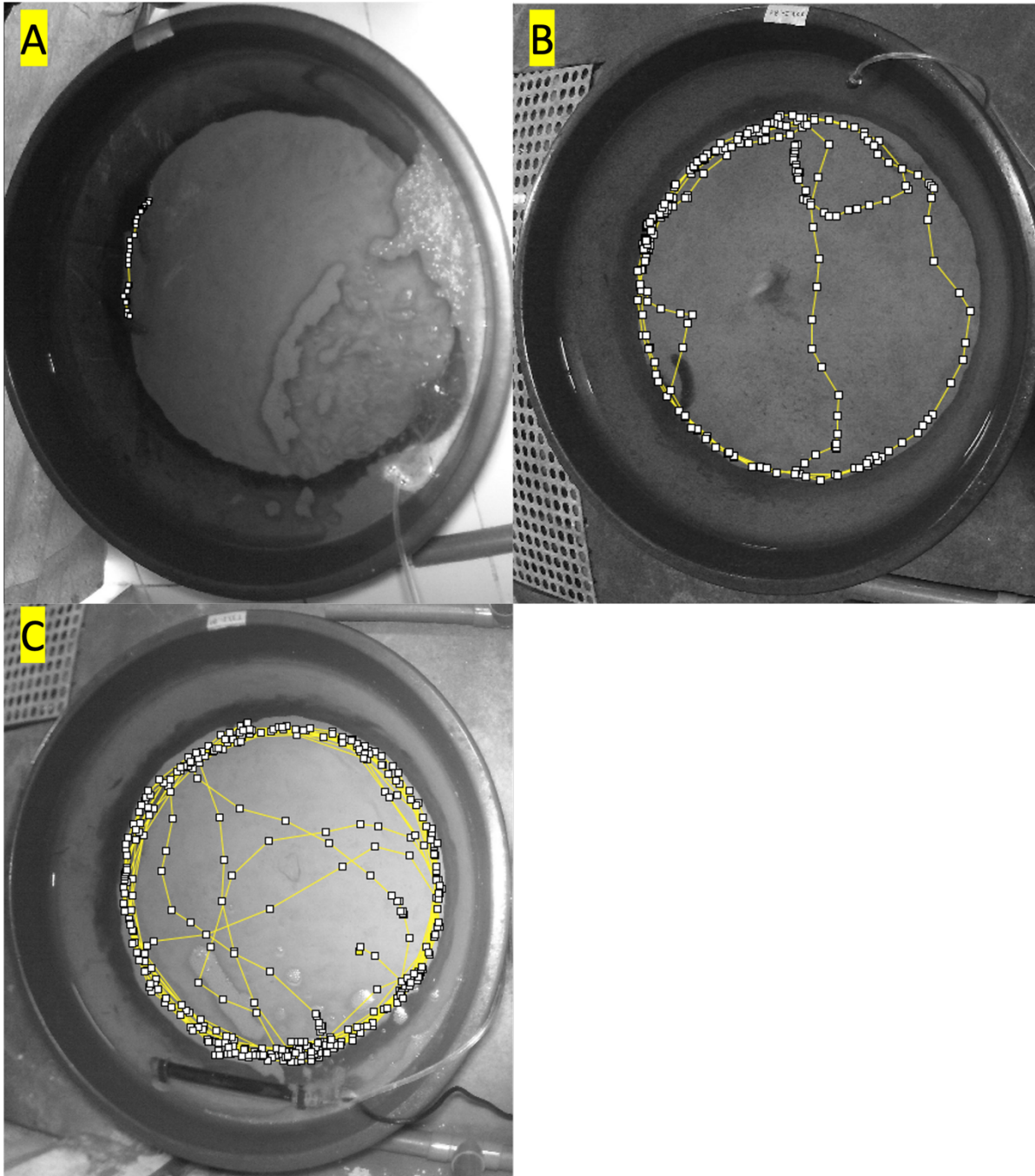


Figure 37. Tracking de 20h à 6h du matin le 10/04/24 de juvéniles d'*H. scabra*. Le petit carré blanc indique la position de l'animal à chaque minute (A) La bassine est maintenue à 22°C. Déplacement cumulé = 19,629 cm ; vitesse moyenne = 0,0005 cm/min. (B) La bassine est maintenue à 27°C. Déplacement cumulé = 326,4 cm ; vitesse moyenne = 0,0091 cm/min. (C) La bassine est maintenue à 22°C. Déplacement cumulé = 1845,206 cm ; vitesse moyenne = 0,0513 cm/min.

BIBLIOGRAPHIE

- Agatsuma, Y. **2020**. Chapter 34 - *Mesocentrotus nudus*. In J. M. Lawrence (Éd.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, vol. 43, 627-641. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00034-2>
- Agudo, N. **2006**. Sandfish hatchery techniques. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), the Secretariat of the Pacific Community (SPC) and the WorldFish Center.
- Asha, P. S., & Diwakar, K. **2013**. Effect of stocking density on the hatching rate, larval and early juvenile rearing of edible sea cucumber *Holothuria scabra* (Jaeger, 1883). *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, vol. 42, no. 2.
- Barry, J. P., Baxter, C. H., Sagarin, R. D., & Gilman, S. E. **1995**. Climate-related, long-term faunal changes in a California rocky intertidal community. *Science*, vol. 267, no.5198, 672-675. <https://doi.org/10.1126/science.267.5198.672>
- Battaglene, S. **1999**. Progress in the production of tropical sea cucumbers *Holothuria scabra* and *Holothuria fuscogilva* for stock enhancement. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, vol. 12, no. 32.
- Battaglene, S. C., Seymour, J. E., & Ramofafia, C. **1999**. Survie et croissance des jeunes concombres de mer d'élevage, *Holothuria scabra*. *Aquaculture*, vol. 178, no. 3, 293-322. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00130-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00130-1)
- Bayne, C. J. **1990**. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience*, vol. 40, no. 10, 723-731. <https://doi.org/10.2307/1311504>
- Becker, P., Gillan, D., Lanterbecq, D., Jangoux, M., Rasolofonirina, R., Rakotovao, J., & Eeckhaut, I. **2004**. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture*, vol. 242, no. 1, 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.018>
- Bell, J. D., Purcell, S. W., & Nash, W. J. **2008**. Restoring small-scale fisheries for tropical sea cucumbers. *Ocean & Coastal Management*, vol. 51, no. 8, 589-593. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2008.06.011>
- Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme | MetaMorphos. (s. d.). marinebiology. Consulté 13 août 2024, à l'adresse <https://www.bio-mar.com/metamorphos>
- Bollard, M. E., Stanley, E. G., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., & Holmes, E. **2005**. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR in Biomedicine*, vol. 18, no. 3, 143-162. <https://doi.org/10.1002/nbm.935>
- Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G. S., Limburg, K. E., Montes, I., Naqvi, S. W. A., Pitcher, G. C., Rabalais, N. N., Roman, M. R., Rose, K. A., Seibel, B. A., Telszewski, M., Yasuhara, M., Zhang, J. **2018**. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, vol. 359, no. 6371. <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>

- Brothers, C. J., Harianto, J., McClintock, J. B., & Byrne, M. **2016**. Sea urchins in a high-CO₂ world: The influence of acclimation on the immune response to ocean warming and acidification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 283, no. 1837. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1501>
- Brothers, C. J., & McClintock, J. B. **2015**. The effects of climate-induced elevated seawater temperature on the covering behavior, righting response, and Aristotle's lantern reflex of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 467, 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.019>
- Carpenter, K. E., & Niem, V. H. (eds). **1998**. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 2. Cephalopods, crustaceans, holothurians and sharks. FAO. <https://www.fao.org/documents/card/en?details=eaa7da00-69eb-5285-a9f1-72fe2648dda9>
- Caulier, G., Hamel, J.-F., & Mercier, A. **2020**. From coelomocytes to colored aggregates : cellular components and processes involved in the immune response of the holothuroid *Cucumaria frondosa*. *The Biological Bulletin*. <https://doi.org/10.1086/710355>
- Chen, H., Diao, X., & Zhou, H. **2018**. Tissue-specific metabolic responses of the pearl oyster *Pinctada martensii* exposed to benzo[a]pyrene. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 131, 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.057>
- Chen, M., Sun, S., Xu, Q., Gao, F., Wang, H., & Wang, A. **2022**. Influence of water temperature and flow velocity on locomotion behavior in tropical commercially important sea cucumber *Stichopus monotuberculatus*. *Frontiers in Marine Science*, vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.931430>
- Chia, F.-S., & Xing, J. **1996**. Echinoderm coelomocytes. *Zoological Studies*, vol. 35, no. 4, 231-254.
- Chiaramonte, M., & Russo, R. **2015**. The echinoderm innate humoral immune response. *Italian Journal of Zoology*, vol. 82, no. 3, 300-308. <https://doi.org/10.1080/11250003.2015.1061615>
- Christensen, A. B., Nguyen, H. D., & Byrne, M. **2011**. Thermotolerance and the effects of hypercapnia on the metabolic rate of the ophiuroid *Ophionereis schayeri*: Inferences for survivorship in a changing ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 403, no. 1, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.04.002>
- Claereboudt, E. J. S., Claereboudt, M. R., Savarino, P., Caulier, G., Gaumez, L., Deleu, M., Gerbaux, P., & Eeckhaut, I. **2023**. A distinct saponin profile drives an olfactory-mediated aggregation in the aquacultivated sea cucumber *Holothuria scabra*. *Marine Drugs*, vol. 21, no. 184. <https://doi.org/10.3390/md21030184>
- Clements, C. S., Pratte, Z. A., Stewart, F. J., & Hay, M. E. **2024**. Removal of detritivore sea cucumbers from reefs increases coral disease. *Nature Communications*, vol. 15, no. 1338. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45730-0>
- Conand, C. **1986**. Les ressources halieutiques des pays insulaires du Pacifique. Deuxième partie : les holothuries. *FAO Documents techniques sur les pêches*, vol. 272, no. 2.
- Conand, C. **1994**. Les holothuries : ressource halieutique des lagons. *Rapport scientifique et techniques*, *Sciences de la mer*, vol. 65.

- Conand, C. **2006**. Sea cucumber biology, taxonomy, distribution and conservation status. 33-50.
- Cooper, E. L., & Lemmi, C. A. E. **1981**. Invertebrate humoral immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 5, 3-21. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(81\)90003-3](https://doi.org/10.1016/0145-305X(81)90003-3)
- Delroisse, J., Van Wayneberghe, K., Flammang, P., Gillan, D., Gerbaux, P., Opina, N., Todinanahary, G. G. B., & Eeckhaut, I. **2020**. Epidemiology of a SKin Ulceration Disease (SKUD) in the sea cucumber *Holothuria scabra* with a review on the SKUDs in Holothuroidea (Echinodermata). *Scientific Reports*, vol. 10, no. 22150. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78876-0>
- Deng, H., Zhou, Z., Wang, N., & Liu, C. **2008**. The syndrome of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) infected by virus and bacteria. *Virologica Sinica*, vol. 23, no. 1, 63-67. <https://doi.org/10.1007/s12250-008-2863-9>
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C., & Martin, P. R. **2008**. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 18, 6668-6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>
- Ding, J., Zheng, D., Sun, J., Hu, F., Yu, Y., Zhao, C., & Chang, Y. **2020**. Effects of water temperature on survival, behaviors and growth of the sea urchin *Mesocentrotus nudus* : new insights into the stock enhancement. *Aquaculture*, vol. 519, no. 734873. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734873>
- Doney, C., Fabry, J., Feely, A., & Kleypas, A. **2009**. Ocean acidification : the other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science*, 169-192. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163834>
- Doney, S. C., Ruckelshaus, M., Duffy, J. E., Barry, J. P., Chan, F., English, C. A., Galindo, H. M., Grebmeier, J. M., Hollowed, A. B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N. N., Sydeman, W. J., & Talley, L. D. **2012**. Climate change impacts on marine ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, vol. 4, 11-37. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041911-111611>
- Dumont, C. P., Drolet, D., Deschênes, I., & Himmelman, J. H. **2007**. Multiple factors explain the covering behaviour in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Animal Behaviour*, vol. 73, no. 6, 979-986. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.11.008>
- Eeckhaut, I., Van Wayenberghe, K., Nicolas, F., & Delroisse, J. **2019**. Skin ulcerations in *Holothuria scabra* can be induced by various types of food. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, vol. 39, 31-35.
- Eliseikina, M., & Magarlamov, T. **2002**. Coelomocyte morphoogy in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). *Russian Journal of Marine Biology*, vol. 28, 197-202. <https://doi.org/10.1023/A:1016801521216>
- Emiroğlu, D., & Günay, D. **2007**. The effect of sea cucumber *Holothuria tubulosa* G. 1788 on nutrient and organic matter contents of bottom sediment of oligotrophy and hypereutrophic shores. *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 16, 290-294.

- Fang, J., Zhang, J., Liu, Y., Jiang, Z., Mao, Y., & Fang, J. **2015**. Effects of temperature and salinity on mortality and metabolism of *Ophiopholis mirabilis*. *Marine Biology Research*, vol. 11, no. 2, 157-167. <https://doi.org/10.1080/17451000.2014.904884>
- Fox, J., Weisberg, S., Price, B., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., Bolker, B., Ellison, S., Firth, D., Friendly, M., Gorjanc, G., Graves, S., Heiberger, R., Krivitsky, P., Laboissiere, R., Maechler, M., Monette, G., Murdoch, D., Nilsson, H., Ogle, D., Ripley, B., Short, T., Venables, W., Walker, S., Winsemius, D., Zeileis, A. **2023**. *car* : Companion to Applied Regression (Version 3.1-2) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/car/index.html>
- Galimany, E., Baeta, M., & Ramón, M. **2018**. Immune response of the sea cucumber *Parastichopus regalis* to different temperatures : implications for aquaculture purposes. *Aquaculture*, vol. 497, 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.005>
- Gooding, R. A., Harley, C. D. G., & Tang, E. **2009**. Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 23, 9316-9321. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811143106>
- Hamel, J.-F., Conand, C., Pawson, D. L., & Mercier, A. **2001**. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea : Echinodermata): Its biology and exploitation as Beche-de-mer. In *Advances in Marine Biology*, vol. 41, p. 129-223. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(01\)41003-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(01)41003-0)
- Hamel, J.-F., Eeckhaut, I., Conand, C., Sun, J., Caulier, G., & Mercier, A. **2022**. Global knowledge on the commercial sea cucumber *Holothuria scabra*. *Advances in Marine Biology*, vol. 91, 1-286. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2022.04.001>
- Herreid, C. F., LaRussa, V. F., & DeFesi, C. R. **1976**. Blood vascular system of the sea cucumber, *Stichopus moebii*. *Journal of Morphology*, vol. 150, no. 2, 423-451. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051500211>
- Hetzl, H. H. **1965**. Studies on holothurian coelomocytes. II. The origin of coelomocytes and the formation of brown bodies. *Biol. Bull.*, vol. 128, 102-111.
- Hildemann, W. H., & Dix, T. G. **1972**. Transplantation reactions of tropical Australian echinoderms. *Transplantation*, vol. 14, no. 5, 624-633. <https://doi.org/10.1097/00007890-197211000-00015>
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R. M., Schuetzenmeister, A., & Scheibe, S. **2024**. *multcomp* : Simultaneous Inference in General Parametric Models (Version 1.4-26) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/index.html>
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). **2022**. The ocean and cryosphere in a changing climate : special report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781009157964>
- Ito, T., Matsutani, T., Mori, K., & Nomura, T. **1992**. Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 16, no. 4, 287-294. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(92\)90003-u](https://doi.org/10.1016/0145-305x(92)90003-u)
- James, D. **1994**. An annotated bibliography on sea-cucumbers.

- James, D. B., & James, P. S. B. R. **1994**. Hand-book on Indian sea-cucumbers. CMFRI Special Publication, no. 59.
- Jasmadi, J., Kusnadi, A., & Triandiza, T. **2015**. A preliminary study of Difur coast, Tual City Kei Islands as site for sandfish *Holothuria scabra* culture.
- Ji, T., Dong, Y., & Dong, S. **2008**. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka): aestivation and temperature. *Aquaculture*, vol. 283, no. 1, 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.006>
- Jimmy, R. A., Pickering, T. D., & Hair, C. A. **2012**. Overview of sea cucumber aquaculture and stocking research in the Western Pacific region. *Australian Centre for International Agricultural Research Proceedings*, vol. 136, 12-21.
- Kamyab, E., Kühnhold, H., Novais, S. C., Alves, L. M. F., Indriana, L., Kunzmann, A., Slater, M., & Lemos, M. F. L. **2017**. Effects of thermal stress on the immune and oxidative stress responses of juvenile sea cucumber *Holothuria scabra*. *Journal of Comparative Physiology B*, vol. 187, no. 1, 51-61. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1015-z>
- Kassambara, A. **2023**. *ggpubr* : « ggplot2 » Based Publication Ready Plots (Version 0.6.0) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html>
- Kato, A., & Hirata, H. **1990**. Comportement diurne et température de l'eau de Manamako en aquarium, vol. 38, no. 1, 75-80. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.38.75>
- Klingenberg, M. **2008**. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1778, no. 10, 1978-2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.04.011>
- Kolde, R. **2019**. *pheatmap* : Pretty Heatmaps (Version 1.0.12) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>
- Krantz, S., Dowle, M., Srinivasan, A., Jacob, M., Eddelbuettel, D., Berge, L., Tappe, K., worldwide, R. C. T. and contributors & Plummer, M. **2024**. *collapse* : Advanced and Fast Data Transformation (Version 2.0.15) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/collapse/index.html>
- Kühnhold, H., Steinmann, N., Huang, Y.-H., Indriana, L., Meyer, A., & Kunzmann, A. **2019**. Temperature-induced aerobic scope and Hsp70 expression in the sea cucumber *Holothuria scabra*. *Plos One*, vol. 14, no. 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214373>
- Lagerspetz, K. Y. H., & Vainio, L. A. **2006**. Thermal behaviour of crustaceans. *Biological Reviews*, vol. 81, no. 2, 237-258. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006998>
- Lang, B. J., Donelson, J. M., Bairos-Novak, K. R., Wheeler, C. R., Caballes, C. F., Uthicke, S., & Pratchett, M. S. **2023**. Impacts of ocean warming on echinoderms : a meta-analysis. *Ecology and Evolution*, vol. 13, no. 8. <https://doi.org/10.1002/ece3.10307>
- Laurance, W. F., Carolina Useche, D., Shoo, L. P., Herzog, S. K., Kessler, M., Escobar, F., Brehm, G., Axmacher, J. C., Chen, I.-C., Gámez, L. A., Hietz, P., Fiedler, K., Pyrcz, T., Wolf, J., Merkord, C. L., Cardelus, C., Marshall, A. R., Ah-Peng, C., Aplet, G. H., del Coro Arizmendi, M., Baker, W. J., Barone, J., Brühl, C., A., Bussmann, R., W., Cicuzza, D., Eilu, G., Favila, M.,

- E., Hemp, A., Hemp, C., Homeier, J., Hurtado, J., Jankowski, J., Kattán, G., Krömer, T., Lees, D., C., Lehnert, M., Longino, J., T., Lovett, J., Martin P., H., Patterson, B., D., Pearson, R., G., Peh, K., S., Richardson, B., Richardson, M., Samways, M., J., Senbeta, F., Smith, T., B., Utteridge, T., M., A., Watkins, J., E., Wilson, R., Williams, S., E. & Thomas, C. D. **2011**. Global warming, elevational ranges and the vulnerability of tropical biota. *Biological Conservation*, vol. 144, no. 1, 548-557. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.10.010>
- Lavitra, T., Fohy, N., Gestin, P.-G., Rasolofonirina, R., & Eeckhaut, I. **2010**. Effect of water temperature on the survival and growth of endobenthic *Holothuria scabra* (Echinodermata : Holothuroidea) juveniles reared in outdoor ponds, vol. 30.
- Lavitra, T., Rasolofonirina, R., & Eeckhaut, I. **2010**. The effect of sediment quality and stocking density on survival and growth of the sea cucumber *Holothuria scabra* reared in nursery ponds and sea pens. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, vol. 9, no. 2.
- Lavitra, T., Rasolofonirina, R., Jangoux, M., & Eeckhaut, I. **2009**. Problems related to the farming of *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833). *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, vol. 29, 20-30.
- Lee, C., & Choi, S. D. **2020**. Optimal growth conditions and economic analysis of sea cucumber releasing. *Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 23, no. 11. <https://doi.org/10.1186/s41240-020-00151-0>
- Lever, M., & Slow, S. **2010**. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry*, vol. 43, no. 9, 732-744. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.03.009>
- Li, H., Qiao, G., Li, Q., Zhou, W., Won, K. M., Xu, D.-H., & Park, S.-I. **2010**. Biological characteristics and pathogenicity of a highly pathogenic *Shewanella marisflavi* infecting sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fish Diseases*, vol. 33, no. 11, 865-877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01189.x>
- Lin, C. Y., Wu, H., Tjeerdema, R. S., & Viant, M. R. **2007**. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics*, vol. 3, no. 1, 55-67. <https://doi.org/10.1007/s11306-006-0043-1>
- Liu, X., Ji, C., Zhao, J., Wang, Q., Li, F., & Wu, H. **2014**. Metabolic profiling of the tissue-specific responses in mussel *Mytilus galloprovincialis* towards *Vibrio harveyi* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 39, no. 2, 372-377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.033>
- Mary Bai, M. **1980**. Monograph on *Holothuria* (Metriatyla) *scabra* Jaeger. *Memoirs of the Zoological Survey of India*, vol. 16, 1-75.
- Massin, C., & Jangoux, M. **1976**. Observations écologiques sur *Holothuria tubulosa*, *H. poli* et *H. forskali* (Echinodermata-Holothuroidea) et comportement alimentaire de *H. tubulosa*. *Cahiers De Biologie Marine*.
- McQuaid, C., & Branch, G. M. **1984**. Influence of sea temperature, substratum and wave exposure on rocky intertidal communities : an analysis of faunal and floral biomass. *Marine ecology progress series*, vol. 19, no. 1, 145-151.

- Mercier, A., Battaglione, S. C., & Hamel, J.-F. **1999**. Daily burrowing cycle and feeding activity of juvenile sea cucumbers *Holothuria scabra* in response to environmental factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 239, no. 1, 125-156. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00034-9)
- Mercier, A., Battaglione, S. C., & Hamel, J.-F. **2000**. Periodic movement, recruitment and size-related distribution of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Solomon Islands. In M. B. Jones, J. M. N. Azevedo, A. I. Neto, A. C. Costa, & A. M. F. Martins (Éds.), *Island, Ocean and Deep-Sea Biology*, 81-100. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1982-7_8
- Mercier, A., & Hamel, J.-F. **2022**. Global knowledge on the commercial sea cucumber *Holothuria Scabra*. Academic Press.
- Morgan, M. B., & Cowles, D. L. **1997**. The effects of temperature on the behaviour and physiology of *Phataria unifascialis* (Gray) (Echinodermata, Asteroidea) implications for the species' distribution in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 208, no. 1, 13-27. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02675-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02675-5)
- Newell, R. C. **1966**. Effect of temperature on the metabolism of poikilotherms. *Nature*, vol. 212, no. 5060, 426-428. <https://doi.org/10.1038/212426a0>
- Nicholls, R. J., & Cazenave, A. **2010**. Sea-level rise and its impact on coastal zones. *Science*, vol. 328, no. 5985, 1517-1520. <https://doi.org/10.1126/science.1185782>
- Ohlberger, J. **2013**. Climate warming and ectotherm body size from individual physiology to community ecology. *Functional Ecology*, vol. 27, no. 4, 991-1001. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12098>
- Pagliara, P., Carnevali, C., Burighel, P., & Ballarin, L. **2003**. The spherule cells of *Holothuria polii* Delle Chiaie, 1823 (Aspidochirota, Holothuroidea) during brown body formation: an ultrastructural study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, vol. 35, no. 3, 295-301.
- Perez, M. L., & Brown, E. O. **2012**. Market potential and challenges for expanding the production of sea cucumber in South-East Asia. FAO <https://agris.fao.org/search/en/providers/122443/records/6473a37c13d110e4e7a78088>
- Pitt, R., & Nguyen, D. Q. D. **2004**. Breeding and rearing of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Viet Nam. In FAO Fisheries Technical Paper. FAO. <https://digitalarchive.worldfishcenter.org/handle/20.500.12348/2069>
- Pohlert, T. **2023**. *PMCMRplus*: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended (Version 1.9.10) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/PMCMRplus/index.html>
- Poloczanska, E. S., Burrows, M. T., Brown, C. J., García Molinos, J., Halpern, B. S., Hoegh-Guldberg, O., Kappel, C. V., Moore, P. J., Richardson, A. J., Schoeman, D. S., & Sydeman, W. J. **2016**. Responses of marine organisms to climate change across oceans. *Frontiers in Marine Science*, vol. 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00062>

- Popov, R. S., Ivanchina, N. V., Kicha, A. A., Malyarenko, T. V., Grebnev, B. B., Dmitrenok, P. S., & Stonik, V. A. **2016**. LC–MS-based metabolome analysis on steroid metabolites from the starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* in conditions of active feeding and stresses. *Metabolomics*, vol. 12, no. 6, 106. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1048-z>
- Purcell, S. **2004**. Criteria for release strategies and evaluating the restocking of sea cucumbers. In *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*, 181-191.
- Purcell, S., Lovatelli, A., González-Wangüemert, M., Solis Marin, F., A., Samyn, Y., & Conand, C. **2023**. Commercially important sea cucumbers of the world. FAO.
- Purcell, S., Samyn, Y., & Conand, C. **2012**. Commercially important sea cucumbers of the world, vol. 6, 150.
- Purcell, S. W. **2010**. Diel burying by the tropical sea cucumber *Holothuria scabra*: Effects of environmental stimuli, handling and ontogeny. *Marine Biology*, vol. 157, no. 3, 663-671. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1351-6>
- Rahman, M., Yusoff, F., & Arshad, A. **2015**. Sea cucumber fisheries: global status, culture, management and extinction risks. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:212504076>
- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., & Rhodes, C. P. **1985**. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. In G. H. Bourne (Éd.), *International Review of Cytology*, vol. 97, 183-350. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62351-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62351-7)
- Robertson, J. D. **1980**. Osmotic constituents of some echinoderm muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, vol. 67, no. 4, 535-543. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(80\)90238-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(80)90238-8)
- Ross Ellington, W., & Hammen, C. S. **1977**. Metabolic compensation to reduced oxygen tensions in the sea cucumber, *Sclerodactyla briareus* (Leseur). *Journal of Comparative Physiology*, vol. 122, no. 3, 347-358. <https://doi.org/10.1007/BF00692520>
- Ru, X., Zhang, L., Li, X., Liu, S., & Yang, H. **2018**. Development strategies for the sea cucumber industry in China. *Journal of Oceanology and Limnology*, vol. 37. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7344-5>
- Shao, Y., Li, C., Chen, X., Zhang, P., Li, Y., Li, T., & Jiang, J. **2015**. Metabolomic responses of sea cucumber *Apostichopus japonicus* to thermal stresses. *Aquaculture*, vol. 435, 390-397. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.023>
- Shukla, P. R., Skeg, J., Buendia, E. C., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H.-O., Roberts, D. C., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., Diemen, S. van, Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Pathak, M., Petzold, J., Pereira, J. P., Vyas, P., Huntley, E., Kissick, K., Belkacemi, M., Malley, J. (Éds.). **2019**. Climate change and land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems.
- Söderhäll, K., & Cerenius, L. **1998**. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, vol. 10, no. 1, 23-28. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(98)80026-5)

- Sun, J., Zhang, L., Pan, Y., Lin, C., Wang, F., & Yang, H. **2018**. Effect of water temperature on diel feeding, locomotion behaviour and digestive physiology in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Experimental Biology*, vol. 221, no. 9. <https://doi.org/10.1242/jeb.177451>
- Toral-Granda, V., Lovatelli, A., & Vasconcellos, M. **2008**. Sea cucumbers : a global review on fisheries and trade. *FAO*, vol. 516, no. 317.
- Tortonese, E., & Vadon, C. **1987** Oursins et holothuries (Échinodermes). *Rome, FAO*, vol. 1, 715-726, 731 et 739.
- Tuwo, A. **1999**. Reproductive cycle of the holothurian *Holothuria scabra* in Saugi Island, Spermonde Archipelago, Southwest Sulawesi, Indonesia. <https://purl.org/spc/digilib/doc/egvdb>
- Tuwo, A., Yasir, I., Syafiuddin, Aprianto, R., Yanti, A., Bestari, A. D., & Tresnati, J. **2020**. Low salinity reduces survival rate of a commercially important sea cucumber (sandfish : *Holothuria scabra*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 564, no. 012088. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/564/1/012088>
- Uthicke, S. **1999**. Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria (Halodeima) atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Bulletin of Marine Science*, vol. 64, no. 1, 129-141.
- Uthicke, S. **2001**. Nutrient regeneration by abundant coral reef holothurians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 265, no. 2, 153-170. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00329-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00329-X)
- Uthicke, S. **2004**. Over fishing of holothurians : lessons from the Great Barrier Reef. In: Lovatelli A., C. Conand, S. Purcell, S. Uthicke, J.-F. Hamel and A. Mercier (Eds.). *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. *Rome, FAO*, vol. 463, 163-171.
- Uthicke, S., & Klumpp, D. **1998**. Microphytobenthos community production at a near-shore coral reef : seasonal variation and response to ammonium recycled by holothurians. *Marine Ecology Progress Series*, vol. 169, 1-11. <https://doi.org/10.3354/meps169001>
- Viant, M. R., Rosenblum, E. S., & Tierdema, R. S. **2003**. NMR-based metabolomics : a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environmental Science & Technology*, vol. 37, no. 21, 4982-4989. <https://doi.org/10.1021/es034281x>
- Wang, F., Yang, H., Gao, F., & Liu, G. **2008**. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, vol. 151, no. 4, 491-498. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.024>
- Watts, S. A., & Lawrence, J. M. **1986**. Seasonal effects of temperature and salinity on the organismal activity of the seastar *Luidia clathrata* (Echinodermata : Asteroidea). *Marine Behaviour and Physiology*, vol. 12, no. 3, 161-169. <https://doi.org/10.1080/10236248609378643>
- Wickham, H. **2023**. *tidyverse* : Easily Install and Load the « Tidyverse » (Version 2.0.0) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/tidyverse/index.html>

- Wickham, H., Bryan, J., Posit, Kalicinski, M. Komarov, V., Leittenne, C., Colbert, B., Hoerl, D. & Miller, E. **2023**. *readxl* : Read Excel Files (Version 1.4.3) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/readxl/index.html>
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D. & van den Brand, T. **2024**. *ggplot2* : Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics (Version 3.5.1) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/index.html>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K. & Vaughan, D. **2023**. *dplyr* : A Grammar of Data Manipulation (Version 1.1.4) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/dplyr/index.html>
- Wickham, H., Vaughan, D., Girlich, M. & Ushey, K. **2024**. *tidyr* : Tidy Messy Data (Version 1.3.1) [Logiciel: RStudio]. <https://cran.r-project.org/web/packages/tidyr/index.html>
- Wolkenhauer, S. **2008**. Burying and feeding activity of adult *Holothuria scabra* (Echinodermata : Holothuroidea) in a controlled environment. SPC Beche Mer Inf Bull, vol. 27.
- Wu, H., Liu, X., Zhao, J., & Yu, J. **2011**. NMR-based metabolomic investigations on the differential responses in adductor muscles from two pedigrees of manila clam *Ruditapes philippinarum* to cadmium and zinc. Marine Drugs, vol. 9, no. 9, 1566-1579. <https://doi.org/10.3390/md9091566>
- Xu, D., Su, L., & Zhao, P. **2015**. *Apostichopus japonicus* in the worldwide production and trade of sea cucumbers. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, vol. 39, 383-398. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799953-1.00021-0>
- Yamanouchi, T. **1956**. The daily activity rhythms of the holothurians in the coral reef of Palao islands. Publications of the Seto Marine Biological Laboratory, vol. 5, no. 3, 347-362.
- Yang, H., Yuan, X., Zhou, Y., Mao, Y., Zhang, T., & Liu, Y. **2005**. Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation. Aquaculture Research, vol. 36, 1085-1092. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01325.x>
- Zhang, L., Liu, X., You, L., Zhou, D., Wang, Q., Li, F., Cong, M., Li, L., Zhao, J., Liu, D., Yu, J., & Wu, H. **2011**. Benzo(a)pyrene-induced metabolic responses in manila clam *Ruditapes philippinarum* by proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) based metabolomics. Environmental Toxicology and Pharmacology, vol. 32, no. 2, 218-225. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.05.006>
- Zhang, L., & Liu, Y. **1998**. Aquaculture techniques of sea cucumber and sea urchin. The Press of Ocean University of Qingdao, Qingdao.
- Zhang, L., Zhang, L., Shi, D., Wei, J., Chang, Y., & Zhao, C. **2017**. Effects of long-term elevated temperature on covering, sheltering and righting behaviors of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. PeerJ, vol. 5. <https://doi.org/10.7717/peerj.3122>
- Zhao, S., Yuan, C., Wan, L., Chen, W., & Liu, J. **2017**. Effect of COS on phagocytic activity of coelomic cell of tropical sea cucumber (*Holothuria scabra*). Gen. Appl. Biol., vol. 36, 3237-3240.

- Zhao, Y., Ma, H., Zhang, W., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, X., & Liufu, Z. **2011**. Effects of dietary β -glucan on the growth, immune responses and resistance of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* against *Vibrio splendidus* infection. *Aquaculture*, vol. 315, no. 3-4, 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.032>
- Zhao, Y., Zhang, W., Xu, W., Mai, K., Zhang, Y., & Liufu, Z. **2012**. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 32, no. 5, 750-755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.027>