



HAL
open science

Etude des interactions hôte/parasite chez l'huître plate *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*

Benjamin Morga

► **To cite this version:**

Benjamin Morga. Etude des interactions hôte/parasite chez l'huître plate *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2010. Français. NNT : 2010LAROS305 . tel-00618480

HAL Id: tel-00618480

<https://theses.hal.science/tel-00618480>

Submitted on 2 Sep 2011

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

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



Université de La Rochelle

ED0523

IFREMER

Laboratoire de Génétique et Pathologie (La Tremblade)

THÈSE

présentée par :

Benjamin MORGA

soutenue le 28 Septembre 2010

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Océanologie biologie et environnement marin

Étude des interactions hôte/parasite chez l'huître plate
Ostrea edulis et son parasite *Bonamia ostreae*

JURY :

Paco BUSTAMANTE Professeur, Université de La Rochelle

Christine COUSTAU Chargé de recherche CNRS, Sophia Antipolis, Rapporteur

Christine PAILLARD Chargé de recherche CNRS, LEMAR, Brest, Rapporteur

Didier BOUCHON Professeur, Université de Poitiers, Examineur

Sarah CULLOTY College Lecturer, University College Cork, Examineur

Tristan RENAULT Cadre de recherche III IFREMER La Tremblade, Directeur de thèse

Isabelle ARZUL Cadre de recherche I IFREMER La Tremblade, Directrice scientifique

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Docteur Tristan Renault, Directeur du laboratoire génétique et pathologie de La Tremblade pour m'avoir accueilli et encadré dans son laboratoire pendant ces trois années de thèse. Je tiens également à remercier Monsieur Jean Prou, Directeur de la station de La Tremblade, pour son accueil chaleureux et sa bonne humeur quotidienne.

Je remercie l'Ifremer et la région Poitou-Charentes qui m'ont offert la possibilité de financer cette thèse, sans oublier l'école doctorale de La Rochelle (particulièrement Jennifer et Brigitte). Je tiens également à remercier Madame Sophie Le Boursicot, responsable de l'école de la Mer, grâce à qui, la soutenance a pu se réaliser dans l'amphithéâtre « René Coutant » de l'aquarium de La Rochelle, sous l'œil de Paul le poulpe ... mais non de la tortue, Maïté.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Paco Bustamente d'avoir accepté de participer à mon Jury de thèse. Je remercie également Mesdames le Docteur Christine Coustau et le Docteur Christine Paillard d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit. Je remercie Monsieur le Professeur Didier Bouchon d'être examinateur de cette thèse. Enfin, merci à Mrs Sarah Culloty d'être examinatrice de cette thèse ; « Thank you very much for your come in La Rochelle for my PhD defence, it's very grateful for me ».

Cependant, mes plus vifs remerciements sont destinés à mes encadrants de thèse. Tout d'abord, Monsieur le Docteur Tristan Renault qui a été mon directeur de thèse. Tristan, merci pour ton implication, tes corrections et tes conseils qui ont été toujours riches et pertinents. Je n'oublierai pas les nombreuses discussions que nous avons eues. C'est une chance pour moi de t'avoir eu comme encadrant. Tu as toujours su trouver les mots pour me guider dans mon travail. Ce fut un immense plaisir de travailler à tes côtés. Et malgré tes nombreuses activités, tu as toujours trouvé le temps de répondre à mes questions. Tu as su me transmettre tout ton dévouement pour la recherche. Pour tout cela, je te remercie énormément.

Enfin, le Docteur Isabelle Arzul qui fut ma responsable scientifique. Isabelle, c'est avec un petit pincement au cœur que j'écris ces quelques lignes. Tu comprendras aisément qu'il m'est difficile de trouver les mots exacts pour exprimer tous mes remerciements. Cela va bientôt faire quatre ans que l'on travaille ensemble. Tout a commencé par mon stage de DEA, puis la thèse. Je te remercie, d'avoir cru en moi et de m'avoir jugé capable de réaliser ce travail. Tu as su faire de cette thèse un vrai moment de bonheur, en étant toujours présente, en me faisant confiance et en sachant me guider dans les moments importants. Tu as été pour moi bien plus que ma responsable, j'ai découvert une personne très attentionnée. Il va m'être difficile de couper ce lien qui nous uni. Je pourrai écrire de longues pages te concernant car j'aurai beaucoup de choses à dire. Mais je vais résumer en t'adressant un immense MERCI. J'espère que l'on sera encore amené à travailler ensemble dans le futur. Dans tous les cas, je te souhaite une bonne continuation tant dans ta vie professionnelle que dans ta vie personnelle.

Ce fut un réel plaisir de travailler au sein du laboratoire génétique et pathologie de La Tremblade et je remercie ici l'ensemble de l'équipe du LGP.

Merci à Jean-Pierre, Céline, Cyrille, Emmanuelle, Bruno et Maeva pour leurs accueils au sein du LCR, Emmanuelle, bonne continuation dans la petite maison Ifremer, merci pour ton aide en histologie. Jean-Pierre merci pour tes nombreux conseils en microscopie ! Céline merci pour tes conseils et ton accueil dans la cellule analytique et surtout pour la gestion de mes « lots ». Cyrille merci, pour tes conseils en informatique ce fut un plaisir de partager quelques moments en ta compagnie pendant une pause ou autre. Je n'oublierai pas non plus Maeva, mon petit rayon de soleil tahitien ! Ce fut un plaisir de partager ces trois années en ta compagnie. Enfin, mon petit Bruno ! Je ne sais pas quoi écrire à ton sujet... Déjà je ne te remercie pas tu n'as jamais voulu couper mes blocs de microscopie électronique !!! Non, blague à part « t'as raison ma Brenda », comment ne pas te remercier mon petit Bruno « le roi de tous les kiki's ». Je suis très heureux d'avoir travaillé avec toi, je n'oublierai pas les manip ponctuées par de nombreuses blagues. Merci pour tous ces moments de joie qui m'ont permis de connaître une personne formidable. Je ne les oublierai pas.

Je tiens également à remercier les personnes de l'équipe pathologie Nicole, Philippe H., Denis et Jean-François. Denis et Philippe merci pour vos conseils et votre aide. Jean-François mon brin d'air Corse aux odeurs de maquis de figatelli et de Casa, merci pour toutes les discussions que nous avons eu, conseils, magagnes et autres. Ce fut un énorme plaisir de t'avoir rencontré et d'avoir travaillé avec toi. Enormes remerciements pour ton aide dans tous les domaines. Juste un petit souvenir, je n'évoquerai que : Grado... A dopu,

Ah ! Nicole, il m'est difficile d'écrire les remerciements te concernant car les quelques lignes que je vais écrire ne suffiront pas. Je n'ai qu'une chose à dire merci, je pense que tu es l'une des personnes qui a contribué à la réalisation de ce travail en m'apportant ton aide technique, ton savoir et ta gestion du laboratoire. Au delà, de tes compétences j'ai rencontré une personne humaine qui donne toujours de son temps et qui fait de son mieux pour que tout se passe bien dans le laboratoire. « Le petit ou ton petit lapin doré » comme tu m'as si bien surnommé te remercie énormément.

Merci également à l'équipe génétique du LGP, et notamment à Sylvie L. et Serge pour votre expérience en génétique sur l'huître plate ainsi que pour le bon déroulement des infections. Abdellah, merci pour les discussions que nous avons pu avoir et se fut toujours un plaisir de te croiser dans les couloirs du labo. Lionel bonne continuation dans le petit monde des huîtres, ce fut un plaisir de partager quelques moments.

Un grand merci à toute l'équipe de l'écloserie, et notamment : Raphaël, les Pascal(s), Jean Christophe, Florence C. Philippe et Christophe, (Vous avez toujours réussi à trouver de la place pour mes petites bêtes...).

Je remercie également Florence R. pour son aide et son accueil, je crois que cela va faire maintenant huit ans que l'on s'est rencontré. Venir te voir dans ton bureau c'est toujours du bonheur, n'oublies pas « la braderie d'Hossegor c'est toujours pour le week-end de Pâques ». Martine merci à toi aussi, pour ton aide dans les commandes ainsi que les petites rigolades que nous avons eues. Maryse et Véro, merci pour votre sourire et votre aide au cours de ces trois années. Je tiens également remercier l'équipe du LERPC, merci de m'avoir accueilli pendant six mois dans le bureau des « Mickey's », merci à Philippe G., Patrice & Annick, Jean-Luc, Oliver,

Sylvie T., Patrick, Stéphane G. Stéphane R., et Daniel. Enfin, merci également aux personnes qui animent le laboratoire de microbiologie de la station : Cyrielle, Jean-côme, Mathilde et Olivier.

Je remercie mes deux stagiaires que j'ai encadré durant ma thèse, Amélie et Sophie. Je remercie également les nombreux stagiaires, thésard, Post doc ; Justine, Géraldine, Imma, Pilar, Sheila, Maria, Antoine, Pierrick, Dimitri, Sophie, Céline, Manu. Yann, merci de m'avoir initié à l'ultimate, merci aussi pour les petits conseils que tu as pu me donner, bonne continuation. Sophie, merci pour ces moments passés dans le bureau, je te souhaite une bonne soutenance et aussi bonne continuation. Julien petit pêcheur d'eau douce !, merci pour tes petits dessins remplis de talent bonne continuation cela a été un plaisir de partager ces quelques années au laboratoire. Delphine merci pour les petits moments que nous avons partagés notamment ceux partagés autour « des gradients de percoll ».

Enfin, comment ne pas parler de mes « chtimis ». Christopher, merci pour tes précieux conseils, très heureux d'avoir partagé une partie de ma thèse à tes côtés, sans oublier la vue de notre idole alias « le Moscato ». Allez une petite pour la route ! « ces tennismans, ils sont chauds du réchaud c'est des vrais baragues à frites ». Le Doc « alias David », ce fut vraiment un plaisir de partager ces quelques mois avec toi, j'ai vécu de très bons moments. Je ne sais comment te remercier. En parlant de toi, je ne peux oublier Delphine, merci de m'avoir accueilli chez vous avec mon doudou alias mon torchon aux formidables odeurs de poisson. Merci à vous deux pour votre accueil et votre soutien, mais n'oubliez pas attention aux confettis... En vous souhaitant une longue vie et puis nous avons rendez vous dans peu de temps pour un heureux événement. Estelle bon courage pour la fin de ta thèse ! Tu vois on y arrive un jour !

Merci à tous mes fradés pour votre soutien et les bons moments que nous avons passé ensemble de Wellington à Ouarzazate en passant par Corté puis Dax et Mimizan-Plage.

Merci à tous mes fradés pour votre soutien et les bons moments que nous avons passé ensemble de Wellington à Ouarzazate en passant par Corté puis Dax et Mimizan-Plage.

Je tiens à remercier Michéline, Jean-Luc et Ludo pour votre soutien.

Je ne serais bien sûr jamais arrivé là sans l'aide et le soutien de ma famille, Kilou, Chantal, Christine, Jean-Paul, Max, Marie-Claire, Elodie et Maxime, merci pour votre soutien et votre amour. Merci à mes parents pour avoir toujours cru en moi, merci de m'avoir soutenu dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci d'avoir parcouru des milliers de kilomètres pour venir me voir. Une grande émotion va à mes deux grand-mères, je suis heureux de vous avoir eu à mes côtés et très heureux de vous offrir ce travail qui est le fruit de tout votre soutien que vous m'avez donné depuis que j'ai vu le jour.

Mes derniers mots et pensées s'adressent à ceux qui nous ont quittés (trop tôt) et avec qui j'aurais eu un énorme plaisir de partager ce moment privilégié.

Pour conclure, j'adresse une tendre pensée à celle qui est dans mon cœur, Amélie, je tiens profondément à te remercier pour ton soutien au quotidien, tes encouragements, et tes attentions qui ont largement contribué à la réalisation de ce travail. Je t'en remercie de tout cœur.

*Merci à vos tous
Adishat's*

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre »
Aristote

Publications présentées dans ce manuscrit

Article n°1: Morga B., Arzul I., Segarra A., Faury N., Chollet B. & Renault T. Genes expressed by *Ostrea edulis* haemocytes during an *in vitro* infection with the parasite *Bonamia ostreae*. (accepté dans *Developmental & Comparative Immunology*)

Article n°2: Morga B., Renault T., Faury N. & Arzul I. New insight in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. (soumis dans *Fish & Shellfish Immunology*)

Article n°3: Morga B., Arzul I., Faury N. & Renault T. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for real time PCR. (sous presse *Fish & Shellfish Immunology*)

Article n°4: Morga B., Arzul I., Chollet B. & Renault T. 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* **26** (6): 836-42.

Article n°5: Morga B., Renault T., Faury N., Chollet B. & Arzul I. Cellular and molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes during kinetic *in vitro* infection by the parasite *Bonamia ostreae*. (soumis dans *International Journal for Parasitology*)

Article n°6: Morga B., Renault T., Faury N., Lerond S., Garcia C., Joly J-P., Chollet B., Robert M., Omnes E., Lapègue S., Harrang E. & Arzul I. *Ostrea edulis* responses following *in vivo* experimental infection with the parasite *Bonamia ostreae*. (pour soumission dans *International Journal for Parasitology*)

Publications non présentées dans ce manuscrit

Article n°7: Arzul I., Gagnaire B., Bond C., Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. & Renault T., 2009. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. (Annexe 1)

Article n°8: Lallias D., Arzul I., Heurtebise S., Ferrand S., Chollet B., Robert M., Beaumont A., Boudry P., Morga B. & S. Lapègue, 2008. *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources* **21**: 423-439. (Annexe 2)

Article n°9: Comesaña P., Cao A., Casas S., Abollo E., Arzul I., Morga B. & Villalba A. Comparison of haemolymph parameters in *Ostrea edulis* strains with different susceptibility to bonamiosis and *Crassostrea gigas* I: THC, DHC, phagocytosis, respiratory burst and nitric oxide production. (en préparation)

Article n°10: Comesaña P., Cao A., Casas S., Abollo E., Arzul I., Morga B. & Villalba A. Comparison of haemolymph parameters in *Ostrea edulis* strains of oysters with different susceptibility to bonamiosis and *Crassostrea gigas* II: cytotoxic enzymatic activities. (en préparation)

Article n°11: Segarra A., Pepin J.F., Arzul I., Morga B., Faury N. & Renault T. Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008 (sous presse Virus Research).

Communications orales et communications affichées

-Lapègue S., Heurtebise S., Harrang E., Morga B., Flahauw E., Sauvage C. & Boudry P. The use of SNPs in characterizing the oyster genome and their resistance to pathogens. EAS, Porto, 5-8 Octobre 2010 (*communication orale*).

-Harrang E., Faury N., Morga B., Arzul I., Heurtebise S., Chollet B. & Lapègue S. An E-QTL approach to detect parts of the genome involved in the expression of candidate genes for resistance to bonamiosis in the european flat oyster, *Ostrea edulis*. EAS, Porto, 5-8 Octobre 2010 (*communication orale*).

-Harrang E., Bierne N., Heurtebise S., Morga B. & Lapègue S. Fragmentation des populations naturelles d'*Ostrea edulis* : une adaptation locale de l'huître plate européenne ? *Ecologie*, Montpellier 2-4 Septembre 2010 (*Poster*).

-Morga B., Arzul I., Faury N., Garcia C., Lerond S., Robert M., Chollet B., Omnes E., Lapegue S and Renault T. Experimental infection by cohabitation challenged between over-infected flat oyster and two different strains of flat oyster *Ostrea edulis*; resistant/tolerant strain to bonamiosis and susceptible strain. Annual Meeting of LCR, Nantes 23-24 Mars 2010. (*communication orale*).

-Lapègue S., Heurtebise S., Harrang E., Morga B., Flahauw E., Sauvage C. & Boudry P. The use of SNPs in characterizing the oyster genome and their resistance to pathogens. SNP Workshop III, Washington 22-24 Mars 2010 (*communication orale*).

-Morga B., Arzul I., Faury N., Garcia C., Lerond S., Robert M., Chollet B., Omnes E., Lapegue S and Renault T. Experimental infection by cohabitation challenged between over-infected flat oyster and two different strains of flat oyster *Ostrea edulis*; resistant/tolerant strain to bonamiosis and susceptible strain. 102th Annual Meeting National Shellfisheries Association, San diego, Californie, 2-5 Mars, 2010 (*communication orale*).

-Morga B., Arzul I., Faury N., Garcia C., Lerond S., Robert M., Chollet B., Omnes E., Lapegue S and Renault T. Étude de la réponse de deux groupes d'huîtres plates *Ostrea edulis* au cours d'infections expérimentales par injection de parasite *Bonamia ostreae*. *Immuninv*, Poitiers, 25-28 Octobre 2009 (*communication orale*).

-Morga B., Arzul I., Faury N., Garcia C., Lerond S., Robert M., Chollet B., Schikorski D., Omnes E., Pepin J.F., Lapegue S., E. Harrang and Renault T. Comparison of two populations of flat oyster *Ostrea edulis*; presenting contrasted susceptibility to bonamiosis: studying haemocyte activities by flow cytometry and following the expression of targeted genes.

European Association of Fish Pathologists, EAFP, Prague, 14-18 Septembre 2009
(communication orale).

-Morga B., Arzul I., Segarra A., Faury N., Chollet B. & Renault T. Modulation of gene expression in haemocytes from *Ostrea edulis* in response to an infection by the parasite *Bonamia ostreae*. 101th Annual Meeting National Shellfisheries Association, Savannah, Georgia, 22-27 Mars 2009 (communication orale)

-Morga B., Arzul I., Faury N., Chollet B. & Renault T. Study of interactions between haemocytes from flat oyster, *Ostrea edulis*, and the parasite *Bonamia ostreae* using flow cytometry and subtractive and suppressive hybridization. Microcell workshop, La Tremblade, 20-21 Mars 2008 (communication orale)

-Morga B., Arzul I., Faury N. & Renault T. Identification of genes expressed during an *in vitro* infection of haemocytes from *Ostrea edulis* with parasites *Bonamia ostreae*. 100th Annual Meeting National Shellfisheries Association, Providence, Rhode Island, April 6-10, 2008 (communication orale)

-Morga B., Arzul I., Chollet B., Gagnaire B. & Renault T. *Bonamia ostreae* modifies activities of *Ostrea edulis* haemocytes. 100th Annual Meeting National Shellfisheries Association, Providence, Rhode Island, April 6-10, 2008. (poster)

-Morga B., Arzul I., Faury N., Gagnaire B., Chollet B., & Renault T. Study of interactions between flat oyster, *Ostrea edulis*, and the parasite *Bonamia ostreae* using flow cytometry and suppression subtractive hybridization (SSH). 13th EAFP International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" European Association of Fish Pathologists, EAFP, Grado, Italy, Septembre 16-20 2007 (communication orale)

-Morga B., Arzul I., Chollet B., Gagnaire B. & Renault T. Etude des interactions entre le parasite *Bonamia ostreae* et son hôte, huître plate *Ostrea edulis* *in vitro*. 45ème Colloque du GPLF (Groupement des Protistologues de Langue Française), Station Biologique Roscoff 29 mai 2007 (poster et communication orale).

-Morga B., Arzul I., Chollet B., Gagnaire B. & Renault T. *Bonamia ostreae* modifies activities of *Ostrea edulis* haemocytes. 100th Annual Meeting National Shellfisheries Association, Providence, Rhode Island, Avril 6-10, 2008. (poster)

-Arzul I., Bond C., Gagnaire B., Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. & Renault T. Flow cytometry to measure impact of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, parasite infecting flat oyster *Ostrea edulis*, in seawater. 13th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. P- 178. Septembre 17-21. Grado, Italy (poster).

-Arzul I., Bond C., Gagnaire B., Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. & Renault T. Flow cytometry to measure impact of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, parasite infecting flat oyster *Ostrea edulis*, in seawater. 13th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. P- 178. 17-21 Septembre 2007. Grado, Italy (poster).

Arzul I., Bond C., Gagnaire B., Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. & Renault T. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, parasite infecting flat oyster *Ostrea edulis*, in sea water, WAS 2007 San Antonio, Texas, USA, 26 Février au 2 Mars, 2007. (communication orale)

-Liste des abréviations-

ACP: Acide Phosphatase
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ADNc: Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ALP: Phosphatase ALcaline
AOD: American Oyster Defensin
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: Acide RiboNucléique messenger
ATP: Adénosine Tri Phosphate
BaP: Benzo(a)Pyrène
BPI: Bactericidal/Permeability-Increasing protein
CRD: Coding Region Domain
CSF: Colony Stimulating Factor
DCFH-DA: 2',7'-DiChloroFluorescein DiAcetate
DD: Death Domain
DEPC: DiEthylPyroCarbonate
DHR 123: DiHydroRhodamine 123
DMSO: DiMéthylSulfOxyde
dNTPs: Deoxy Nucléotides TriPhosphates
DSCAM: Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
ECP: Extra Cellular products
ec-SOD: extracellular SuperOxide Dismutase
EDTA: Ethylène Diamine Tétraacetic Acid
EOR : Espèces Oxygénées Réactives
EST: Expressed Sequenced Tags
FAO: Food and Agriculture Organization
FDA: Fluorescein DiAcetate
FITC: Fluorescein IsoThioCyanate
FREP: Fibrinogen-RElated Proteins
GFP: Green Fluorescent Protein
GPX: Glutathion PeroXydase
GRED: Glutathion REDuctase
GSH: Glutathion réduit
GST: Glutathion-S-Transférase
GTP: Guanosine TriPhosphate
HAPs: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HSP: Heat Shock Protein
IAP: Inhibitor of apoptosis
IFN: InterFéroN
IFREMER: Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Ig: ImmunoGlobulines
IL: InterLeukine
iNOS: induction Oxyde Nitrique Synthetase
IP: Iodure de Propidium
IRF: Interferon Regulatory Factor
LBP: Lipopolysaccharide Binding Protein
L-Dopa: L- dihydrophénylalanine
LERPC: Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais
LPG: LipoPhosphoGlycan

LGP: Laboratoire de Génétique et Pathologie
LPS: LipoPolySaccharides
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
MASPs: MBL- Associated Serines Protéases
MBL: Manose-Binding Lectin
MCP: Mort Cellulaire Programmée
MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus
MT: MétalloThionéine
MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene 88
NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (forme réduite)
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (forme réduite)
NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B
NK: Natural Killer
NO: Nitric Oxide
NOS: Nitrite Oxyde Synthétase
 ω -GST: omega Gluthatione-S-Transferase
OIE: Office Internationale des Epizooties
ORF: Open Reading Frame
Oligo dT: Oligonucleotide deoxyThymidine
OsHV-1: Oyster HerpesVirus type 1
PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDS: Particules Denses Structurées
PMA: Phorbol Myristate Acétate
PRPs: Pathogen Recognition Pattern
Prx 6: Peroxiredoxin-6
pH: Potentiel Hydrogène
PKC: protéine kinase C
PO: PhénolOxydase
PTKS: protéines tyrosine kinases
QPX: Quahog Parasite X
QTL: Quantitative Trait Locus
RACE PCR: Rapid Amplification of cDNA Ends PCR
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
ROI: Reactive Oxygen Intermediates
ROS: Reactive Oxygen Species
RT: Reverse Transcription
sHSP: small Heat Shock Protein
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SOD: SuperOxide Dismutase
SSH: Suppressive Subtractive Hybridization
TBT: TriButylTin
TGF: Transforming Growth Factors
TLR: Toll Like Recetor
TIMP: Tissue Inhibitor Metallo-Proteinase
Tm: Temperature of melting
TNF: Tumeur Necrosing Factor
TIR: Toll Interleukine Receptor
TRAP: Tumor Receptor Associated Protein
UV: Ultra-Violet
VHSV: Viral Hemorrhagic Septicemia virus

-Sommaire-

| | |
|--|-----------|
| Introduction générale | 1 |
| <hr/> | |
| Première partie : rappels bibliographiques | 7 |
| <hr/> | |
| I Aquaculture mondiale et conchyliculture | 9 |
| I.1 Production de mollusques au niveau mondial | 9 |
| I.2 Production de mollusques en Europe | 11 |
| I.3 Conchyliculture en France en 2010 | 11 |
| | |
| II L'hôte | 12 |
| II.1 L'huître plate, <i>Ostrea edulis</i> | 12 |
| II.1.1 L'histoire... de l'huître plate en France | 12 |
| II.1.2 Répartition géographique | 14 |
| II.1.3 Systématique | 16 |
| II.2 Biologie de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i> | 16 |
| II.2.1 Cycle biologique | 16 |
| II.2.2 Ecologie de l'huître plate | 18 |
| II.2.3 Techniques d'élevage de l'huître plate | 19 |
| II.2.3.1 Captage de naissain naturel | 19 |
| II.2.3.2 Production de naissain en écloserie | 19 |
| II.2.3.3 Grossissement | 20 |
| II.3 Les hémocytes, cellules aux multiples fonctions | 21 |
| II.3.1 Différents types hémocytaires | 21 |
| II.3.2 Propriétés des hémocytes | 23 |
| II.3.3 Fonctions des hémocytes | 25 |
| II.4 Les mécanismes de défense chez les mollusques bivalves | 26 |
| II.4.1 Mécanismes à médiation cellulaire | 26 |
| II.4.1.1 Infiltration hémocytaire | 26 |
| II.4.1.2 Encapsulation | 27 |
| II.4.1.3 Phagocytose | 29 |
| II.4.1.3.1 Processus de la phagocytose | 29 |
| II.4.1.3.2 Reconnaissance, attachement et voies de signalisation | 30 |
| II.4.1.3.3 Internalisation | 34 |
| II.4.1.3.4 Dégradation des particules internalisées | 35 |

| | | |
|------------|--|----|
| II.4.1.3.5 | Devenir des particules étrangères phagocytées dans les hémocytes | 38 |
| II.4.1.3.6 | Types hémocytaires impliqués dans la phagocytose | 39 |
| II.4.1.4 | Mort cellulaire programmée (MCP) ou apoptose | 41 |
| II.4.2 | Substances solubles présentes dans l'hémolymphe | 43 |
| II.4.2.1 | Enzymes hydrolytiques lysosomales | 43 |
| II.4.2.2 | Protéines de stress | 45 |
| II.4.2.3 | Système pro-phénoloxydase/ phénoloxydase | 45 |
| II.4.2.4 | L'Oxyde Nitrique Synthétase | 46 |
| II.4.2.5 | Inhibiteurs de protéases | 46 |
| II.4.2.5.1 | α 2-macroglobuline | 47 |
| II.4.2.5.2 | Serpines | 47 |
| II.4.2.5.3 | Inhibiteurs de métalloprotéases | 48 |
| II.4.2.6 | Peptides antimicrobiens | 48 |
| II.4.2.7 | Cytokines | 49 |
| II.4.3 | Facteurs affectant les mécanismes de défense chez les mollusques | 51 |
| II.4.3.1 | Origine génétique | 51 |
| II.4.3.2 | Environnement | 51 |
| II.4.3.2.1 | Facteurs naturels | 52 |
| II.4.3.2.2 | Contaminants | 53 |
| II.4.3.3 | Agents infectieux | 54 |
| II.4.4 | Mémoire et spécificité immunitaire chez les invertébrés ? | 55 |
| II.4.4.1 | Pathogen Recognition Pattern (PRPs) | 56 |
| II.4.4.2 | Priming | 57 |

III La bonamiose maladie due au parasite *Bonamia ostreae* **61**

III.1 Le parasite *Bonamia ostreae* **61**

| | | |
|---------|--|----|
| III.1.1 | Morphologie et ultrastructure | 62 |
| III.1.2 | Distribution géographique | 63 |
| III.1.3 | Taxinomie | 63 |
| III.1.4 | Cycle de développement et transmission | 63 |

III.2 La maladie : la bonamiose **65**

| | | |
|-----------|---------------------------------------|----|
| III.2.1 | Période d'infection | 65 |
| III.2.2 | Espèces sensibles | 66 |
| III.2.3 | Facteurs biotiques et bonamiose | 66 |
| III.2.3.1 | Age | 66 |
| III.2.3.2 | Taille et poids | 66 |
| III.2.3.3 | Période de maturation | 67 |
| III.2.4 | Facteurs abiotiques et bonamiose | 67 |
| III.2.4.1 | Température | 67 |
| III.2.4.2 | Pratiques culturales et zootechniques | 68 |
| III.2.5 | Méthodes de diagnostic | 68 |

III.3 Moyens de lutte contre la bonamiose **70**

| | | |
|---------|-----------------------------------|----|
| III.3.1 | Prophylaxie et contrôle sanitaire | 70 |
| III.3.2 | Amélioration génétique | 70 |

| | |
|--|-----------|
| IV Système hôte/parasite, interactions durables | 72 |
| IV.1 Parasitisme | 73 |
| IV.1.1 Transmission parasitaire | 73 |
| IV.1.2 Cycle parasitaire et implication d'un ou plusieurs hôtes | 73 |
| IV.2 Interactions durables : le système hôte-parasite | 74 |
| IV.2.1 Rencontre et compatibilité | 74 |
| IV.2.2 Course aux armements | 76 |
| IV.3 Se faire accepter, exploiter et se multiplier | 76 |
| IV.3.1 Parasites intracellulaires chez les vertébrés et <i>Bonamia ostreae</i> | 77 |
| IV.3.1.1 Entrer sans frapper dans la cellule hôte | 77 |
| IV.3.1.1.1 <i>Leishmania sp</i> | 77 |
| IV.3.1.1.2 <i>Trypanosoma cruzii</i> | 78 |
| IV.3.1.1.3 <i>Toxoplasma sp. et Plasmodium sp.</i> | 80 |
| IV.3.1.1.4 <i>Bonamia ostreae</i> | 81 |
| IV.3.1.2 « Tenue correcte exigée » pour ne pas se faire dégrader | 81 |
| IV.3.1.2.1 Remodelage intracellulaire après internalisation | 81 |
| IV.3.2.1.2 Manipulation du système immunitaire de l'hôte par le parasite | 83 |
| IV.3.2 Interactions entre parasite et mollusques bivalves | 86 |
| IV.3.2.1 <i>Perkinsus marinus</i> et <i>Crassostrea virginica</i> | 86 |
| IV.3.2.2 <i>Marteilia sydneyi</i> et <i>Saccostrea glomerata</i> | 88 |

Deuxième partie : Acquisition de données moléculaires chez l'huître plate, *Ostrea edulis*

| | |
|--|------------|
| I Identification d'ESTs d'intérêt suite à une infection des hémocytes d'huître plate <i>in vitro</i> par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> | 95 |
| Article 1 | 96 |
| II Etude la réponse moléculaire chez les hémocytes de deux populations d'huîtres plates infectés par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> | 127 |
| Article 2 | 128 |
| III Identification de gènes de ménage chez <i>Ostrea edulis</i> infectée par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> | 155 |
| Article 3 | 157 |

| | |
|--|------------|
| IV Résultats complémentaires | 185 |
| IV.1 Caractérisation et étude de l'expression du gène Oe-MyD88, codant une protéine adaptatrice de la voie de signalisation IL-1 et Toll like récepteur | 186 |
| IV.1.1 Identification du gène OeMyD88 par RACE PCR | 188 |
| IV.1.2 Analyse phylogénétique du gène OeMyD88 | 188 |
| IV.1.3 Analyse du niveau d'expression du gène OeMyD88 chez des hémocytes d'huître plate infectés par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> | 188 |
| IV.2 Caractérisation du gène Oe-C1q | 189 |
| IV.2.1 Identification du gène C1q par RACE PCR | 190 |
| IV.2.2 Analyse phylogénétique du gène OeC1q | 191 |
| V Conclusion | 193 |
| <hr/> | |
| Troisième partie : Interactions entre hémocytes d'huître plate (<i>Ostrea edulis</i>) et son parasite <i>Bonamia ostreae</i> | 195 |
| <hr/> | |
| I Effet du parasite <i>Bonamia ostreae</i> sur les activités hémocytaires : une première approche | 198 |
| Article 4 | 199 |
| II Réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes d'huître plate suite à une infection in vitro par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> : un suivi au cours du temps | 207 |
| Article 5 | 209 |
| III Comparaison de la réponse cellulaire et moléculaire de deux groupes d'huîtres plates suite à des infections expérimentales : quelles bases pour la résistance à la bonamiose ? | 239 |
| Article 6 | 241 |
| IV Résultats complémentaires | 267 |
| IV.1 Analyse des activités enzymatiques dans l'hémolymphe, le plasma et des hémocytes totaux par galerie API ZYM (Api System, Bio-Merieux) chez deux populations d'huîtres plates <i>Ostrea edulis</i> et chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> | 267 |

| | |
|--|------------|
| V Conclusion | 271 |
| Conclusion générale et perspectives | 273 |
| Références bibliographiques | 287 |
| Index des figures | 304 |
| Index des tableaux | 307 |
| Annexes | 308 |
| Annexe 1 : Article n°7 : Effects of temperature and salinity on the survival of <i>Bonamia ostreae</i> , a parasite infecting flat oysters <i>Ostrea edulis</i> | 309 |
| Annexe 2 : Article n°8 : <i>Bonamia ostreae</i> -induced mortalities in one-year old European flat oysters <i>Ostrea edulis</i> : experimental infection by cohabitation challenge | 319 |

Introduction générale

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française et plus particulièrement de la production de mollusques bivalves. Elle repose principalement sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et dans une moindre mesure sur l'huître plate, *Ostrea edulis*, produites à hauteur de respectivement 128 000 et 1 950 tonnes en 2007 (FAO 2009).

L'histoire de l'ostréiculture française met en évidence la fragilité de cette production face à la surexploitation des stocks et l'apparition de maladies. En effet, il est fortement suspecté que des virus apparentés à la famille des *Iridoviridae* aient décimé les populations d'huîtres creuses portugaises, *Crassostrea angulata*, entre 1967 et 1971 (Comps 1970, Comps et Duthoit, 1976). Ultérieurement, l'huître plate, *Ostrea edulis*, a subi l'impact de deux maladies parasitaires : la marteillose et la bonamiose qui ont engendré une diminution importante de la production. Cette production est en effet passée de 20 000 tonnes produites annuellement dans les années 70 à moins de 2 000 tonnes aujourd'hui (Comps 1970b, Herrbach 1971, Grizel *et al.*, 1974, Pichot *et al.*, 1979, Grizel, 1985, Gouletquer & Héral, 1997). A l'échelle européenne, la production d'huîtres plates a également souffert de l'impact de ces deux maladies parasitaires. À ce jour, les principaux pays producteurs sont l'Espagne (3 215 tonnes), la France (1 960 tonnes), la Croatie (500 tonnes), l'Irlande (382 tonnes), le Royaume-Uni (91 tonnes) et les Pays-Bas (90 tonnes) (FAO, 2009). La production d'huîtres en Europe et en France repose majoritairement sur l'élevage de l'huître creuse du Pacifique *C. gigas*.

La production d'huîtres plates reste aujourd'hui fortement impactée par la présence du parasite *Bonamia ostreae*. Pour diminuer les effets de ce parasite, les moyens de lutte sont relativement restreints. Du fait de l'élevage des huîtres en milieu ouvert, l'utilisation de traitements reste limitée et inadaptée de fait. De plus, l'absence de mémoire immunitaire (au sens conventionnel du terme) chez les invertébrés, ne permet pas d'utiliser la vaccination comme moyen prophylactique contre cette maladie. Ainsi, les moyens de lutte reposent essentiellement :

- sur la surveillance des stocks afin de limiter la dissémination et la propagation de la maladie,
- sur l'utilisation de modèles prédictifs de l'évolution de la maladie en zone infectée afin d'optimiser la gestion des stocks et minimiser l'impact du parasite,

- et enfin, sur le développement d'animaux résistants/tolérants à l'infection présentant une meilleure survie.

Ces différentes approches nécessitent des outils de diagnostic adaptés, une bonne connaissance du cycle de vie de l'agent pathogène, et plus particulièrement des interactions **hôte - parasite - environnement** (Snieszko 1974) (**Figure 1**).

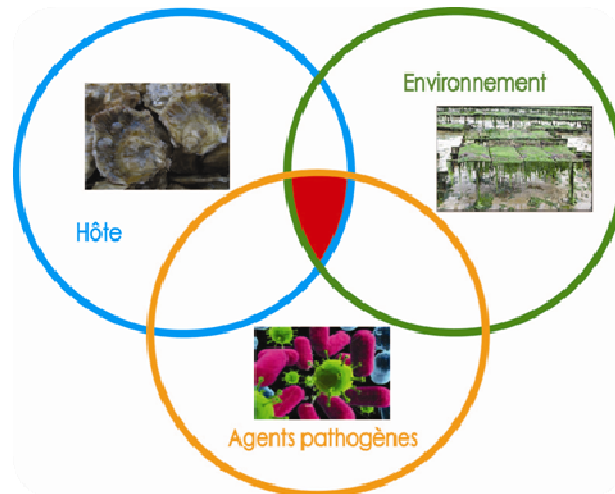


Figure 1 : Schéma des interactions hôte/pathogène/parasite (modifié d'après Snieszko,1974)

Depuis sa détection en association à des mortalités d'huîtres plates sur l'île Tudy en Bretagne en 1979 (Pichot *et al.*, 1980), la bonamiose, maladie due au parasite protozoaire *Bonamia ostreae*, a fait l'objet de nombreux travaux de recherche. Ces travaux ont consisté à clarifier la position taxonomique de l'agent responsable notamment pour développer des outils diagnostiques sensibles et spécifiques et pour comprendre l'impact du parasite sur son hôte et plus particulièrement sur les cellules cibles que sont les hémocytes.

La bonamiose est listée comme maladie à déclaration obligatoire de l'Office international des Epizooties (OIE), et la réglementation de l'Union Européenne en raison de son impact économique sur la filière ostréicole française et européenne. Les travaux de recherche effectués sur le développement d'outils de détection ont permis de sélectionner trois techniques recommandées par le manuel de

diagnostique de l'OIE (2009) ; le diagnostic sur coupes histologiques, les appositions de tissus cardiaques et la PCR.

Plus récemment des techniques moléculaires ont été développées comme la PCR en temps réel ou l'hybridation *in situ* (Cochennec *et al.*, 2000 ; Carnegie *et al.*, 2003, Robert *et al.*, 2009) qui offrent de nouvelles possibilités de part leur sensibilité et spécificité notamment pour l'étude et la compréhension du cycle de vie du parasite.

Le parasite *Bonamia ostreae* a été apparenté au groupe des « microcell » décrit par Katkansky *et al.*, (1969) et Farley *et al.*, (1988). Les parasites « microcell » sont caractérisés par leur petite taille et regroupent les parasites des genres *Bonamia* et *Mikrocytos*. L'étude ultrastructurale de ces parasites a permis d'éclaircir partiellement leur classification. L'analyse du gène codant pour l'ARNr de la petite sous unité ribosomale de ces parasites a permis de clarifier leurs relations phylogénétiques et de confirmer l'inclusion des parasites *B. ostreae*, *B. exitiosa* (agent de la bonamiose chez l'huître *Ostrea chilensis* en Nouvelle Zélande), *B. perspora* et *Mikrocytos roughleyi* (agent de la mikrocytose chez l'huître australienne, *Saccostrea glomerata*) dans le phylum des *Haplosporidia*. L'analyse d'autres gènes d'intérêt phylogénétique par des approches de génomique comparative semble nécessaire afin de clarifier leur position taxonomique.

L'étude de *Bonamia ostreae* en microscopie électronique à transmission a permis d'observer à l'intérieur des cellules hôtes, les hémocytes, différents stades de division du parasite. Ces différents stades de division pourraient correspondre à un mode de division binaire de type schizogonique. Des formes plasmodiales, peu fréquentes, ont également été décrites (Bréhelin *et al.*, 1982). Malgré certaines études sur le cycle d'infection du parasite (Van Banning, 1990 ; Montes *et al.*, 1994), celui-ci reste inconnu avec toutefois une constante : aucune spore n'a jamais été décrite.

En outre, la possibilité pour le parasite d'infecter des huîtres saines par simple contact (cohabitation) avec des huîtres infectées a été démontrée expérimentalement, semblant montrer qu'un hôte intermédiaire n'est pas nécessaire dans le cycle

parasitaire. L'obtention de parasites purifiés (Miahle *et al.*, 1988) a largement aidé à reproduire la bonamiose en laboratoire (Hervio, 1995).

Par ailleurs, la purification du parasite et la primoculture d'hémocytes (Mourton *et al.*, 1992 ; Perroquin, 1995) ont permis l'étude *in vitro* des interactions entre *Bonamia ostreae* et hémocytes (Mourton *et al.*, 1992 ; Chagot *et al.*, 1992, Cochenec 2001, Xue, 1998). Chez les mollusques bivalves, le système de défense repose essentiellement sur les cellules circulantes, les hémocytes présents dans tous les tissus et dans l'hémolymphe. Leurs fonctions principales sont l'élimination de particules étrangères (notamment d'agents infectieux) par l'intermédiaire de la phagocytose et de la production de molécules extracellulaires visant à détruire les organismes pathogènes. Les travaux réalisés par Xue (1998), consacrés à la caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'huître plate, ont permis de déterminer la distribution des hémocytes dans l'hémolymphe et de caractériser les activités cellulaires et enzymatiques de ces cellules.

Les hémocytes peuvent également être les cellules cibles des infections causées par certains agents pathogènes, tel que *Bonamia ostreae* (Comps *et al.*, 1980). Ce parasite se multiplie à l'intérieur des hémocytes sans être dégradé. Les hémocytes peuvent donc jouer le rôle de vecteur pour la distribution du parasite dans l'organisme et le développement de la maladie.

Le développement d'animaux résistants (Naciri *et al.*, 1998) a ouvert des perspectives concernant l'étude des mécanismes cellulaires de défense impliqués dans les phénomènes de sensibilité et de résistance. La sélection génétique a été réalisée sur des animaux présentant un meilleur taux de survie suite à des infections expérimentales (Hervio 1992) puis ces mêmes individus ont servi de géniteurs pour un programme de sélection génétique d'huître plate réalisé par l'Ifremer (Martin *et al.*, 1993 ; Naciri, 1994 ; Naciri *et al.*, 1998).

Les mécanismes de défense de l'huître impliqués dans la résistance à la bonamiose ont été peu étudiés. Une étude a montré que les activités des estérases et la production de radicaux oxygénés sont plus élevées chez les individus sélectionnés que chez les individus sauvages (Cochennec, 2001). Plus récemment, des travaux de

généétiques quantitatives ont été réalisés visant à identifier des QTLs (Quantitative Trait Locus) impliqués dans la résistance à la bonamiose (Lallias *et al.*, 2009).

Ainsi, la bonamiose représente un modèle intéressant d'étude des interactions hôtes bivalves/agents pathogènes de part la possibilité de **purifier** le parasite, de **reproduire** la maladie en laboratoire et de part l'existence de **lignées d'huîtres plates résistantes** à la maladie (**Figure 2**).

La bonamiose représente également un modèle d'étude de parasitisme particulier du fait du **double rôle** joué par les **hémocytes** dans cette maladie. En effet, ils sont à la fois les **cellules effectrices des mécanismes de défense** et les **cellules hôtes du parasite**.

Dans ce contexte, il apparaît nécessaire d'approfondir les connaissances sur les interactions hôte/parasite afin de mieux comprendre la réponse de l'huître vis à vis du parasite et d'identifier les mécanismes de résistance à la maladie. L'apport de ces nouveaux éléments a pour perspectives de sélectionner des huîtres résistantes à la maladie et donc à plus long terme de relancer la culture de l'huître plate. La relance de la culture de l'huître plate semble une voie à explorer pour le maintien de la filière ostréicole française et européenne au vu des mortalités massives d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* observées depuis 2008. Maintenir une diversité dans la filière ostréicole pourrait permettre de limiter les effets de certains agents infectieux spécifiques d'espèce.

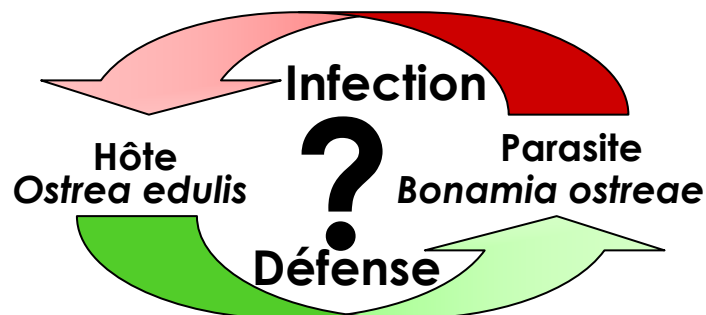


Figure 2 : Modèle d'étude des interactions hôte (huître plate)/parasite (*Bonamia ostreae*)

Le travail de thèse a donc consisté à étudier les interactions hôte/parasite et plus particulièrement la réponse de l'hôte *Ostrea edulis* à l'infection par *Bonamia ostreae* aux niveaux cellulaire et moléculaire.

Ce mémoire s'organise en trois parties.

La première partie est consacrée aux rappels bibliographiques portant sur le modèle d'étude, l'huître plate, *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*. Dans cette synthèse bibliographique, un rappel est fait sur les principaux mécanismes de défense chez les invertébrés et plus particulièrement chez les mollusques. Ensuite, un point est consacré à l'infection par *B. ostreae*. Enfin, cette première partie s'achève sur une présentation des interactions entre hôte et parasite intracellulaire chez les vertébrés et invertébrés aquatiques.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans une deuxième et troisième parties.

La deuxième partie concerne l'acquisition de données moléculaires chez l'huître plate *Ostrea edulis* en réponse à l'infection par le parasite *Bonamia ostreae*. La réalisation de banques soustractives a permis d'identifier des ESTs différenciellement exprimées et potentiellement impliquées dans les interactions hôte-parasite.

La troisième partie est consacrée à l'étude de la réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes d'huître plate à l'infection par le parasite au travers d'expérimentations menées *in vitro*. Ces essais ont été complétés par la réalisation d'une étude comparative de la réponse de deux populations d'huîtres plates (sélectionnées pour leur résistance et naturelles) au cours d'infections expérimentales *in vivo*.

Une conclusion générale sur le travail ainsi que les perspectives envisagées clôturent le mémoire.

1^{ère} Partie

Rappels bibliographiques

I L'aquaculture : La production

I.1 Production de mollusques au niveau mondial

L'essentiel de la production mondiale aquacole repose sur la production de poissons, de crustacés et de mollusques. La production d'organismes dulçaquicoles représente 56,6% en volume et 50,1% de la valeur totale. La mariculture représente 36% des quantités produites et 33,6% de la valeur totale. La production marine est principalement composée de poissons à forte valeur ajoutée, mais tient compte également d'un volume important de moules et d'huîtres à faible valeur ajoutée.

En 2006, plus de la moitié de la production aquacole mondiale est constituée de poissons d'eau douce. La production s'élève à 27,8 millions de tonnes, pour une valeur de 29,5 milliards de dollars. Cette même année, les mollusques occupent la deuxième place avec 14,1 millions de tonnes (27% de la production totale), pour une valeur de 11,9 milliards de dollars. Malgré un volume très inférieur 4,5 millions de tonnes la valeur de la production de crustacés est bien plus considérable: 17,95 milliards de dollars.

Cependant, cette répartition ne tient pas compte de la production de plantes aquatiques. La production mondiale de plantes aquatiques issues de l'aquaculture s'est élevée à 15,1 millions de tonnes (7,2 milliards de dollars).

La famille de mollusques la plus représentée est celle des ostréidés (huîtres) avec plus de 4.6 millions de tonnes. Viennent ensuite les vénéridés (3 millions de tonnes), les mytilidés (moules) et les pectinidés (coquilles Saint Jacques et pétoncles). L'espèce de mollusque la plus produite au monde est l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* 4,2 millions de tonnes. Le principal pays producteur est la Chine, la France occupant le quatrième rang mondial et le premier au niveau européen pour la production de l'huître japonaise.

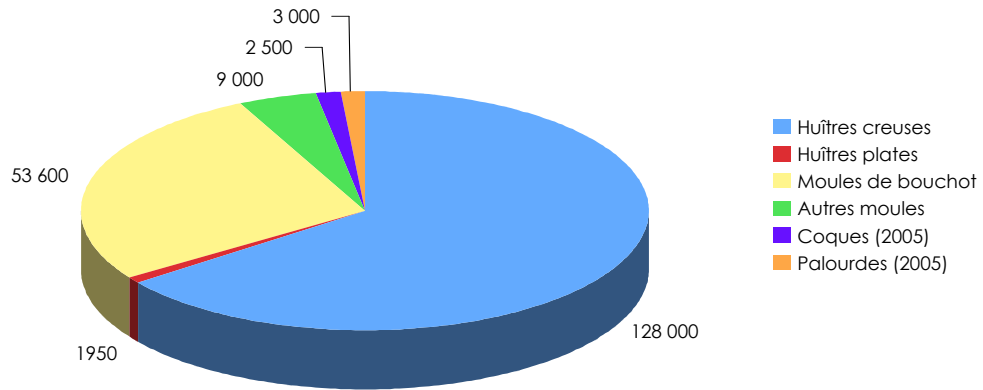


Figure 3 : Production en tonnes des principaux coquillages en France (CNC 2009) (<http://www.cnc-france.com>)

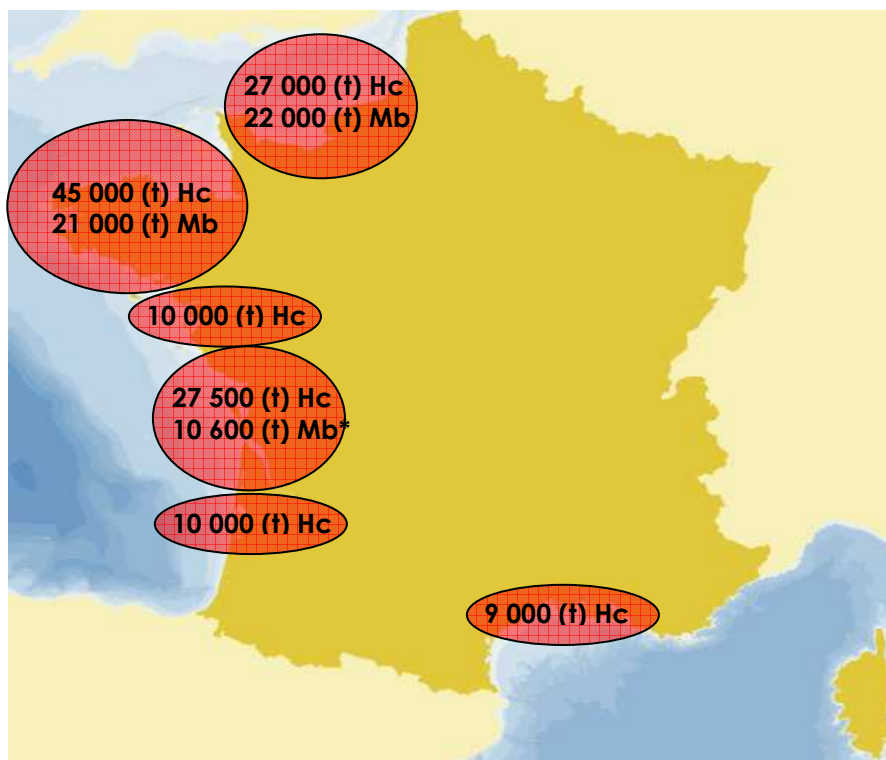


Figure 4 : Production d'huîtres creuses et de moules de bouchot en 2009 dans les principaux sites d'élevage (CNC 2009)

I.2 Production de mollusques en Europe

La production mondiale de mollusque est d'environ 13 millions de tonnes. L'Europe est le deuxième continent (0,69 millions de tonnes) en quantité totale de production de mollusques loin derrière l'Asie (11,6 millions de tonnes). Au niveau européen, la France se classe deuxième (188 870 tonnes) derrière l'Espagne qui est le premier producteur européen de mollusque avec 217 749 tonnes. L'Italie termine ce podium avec une production de 120 318 tonnes. L'Espagne se classe première grâce à sa forte production de moules (209 633 tonnes), la France est le premier producteur d'huîtres avec une production annuelle de 128 500 tonnes d'huître creuse *Crassostrea gigas* (FAO 2007, CNC 2009).

En Europe, l'huître creuse n'est pas la seule huître cultivée. L'huître plate, *Ostrea edulis*, huître indigène des côtes européennes connaît une production réduite d'environ 6 200 tonnes par an pour l'Union Européenne. Cette production réduite est liée en particulier aux effets de deux parasites *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*. L'Espagne est le premier producteur (3 215 tonnes), suivie par la France (1960 tonnes) et la Croatie (500 tonnes) et l'Irlande (382 tonnes).

I.3 Conchyliculture en France en 2010

La production française de coquillages repose essentiellement sur la production d'huîtres creuses et de moules de bouchot (**Figure 3**). La production d'huîtres creuses est de 128 500 tonnes pour l'année 2009 et de 53 600 tonnes pour la production de moules de bouchot. La production de coquillages en France est complétée par la production de moules (autre que bouchot) (9 000 tonnes), de palourdes (3 000 tonnes), de coques (2 500 tonnes) et d'huîtres plates (1960 tonnes). Les sites de production sont localisés sur la façade maritime méditerranéenne, atlantique, bretonne et normande (**Figure 4**).

II L'hôte

II.1- L'huître plate, *Ostrea edulis*

L'huître plate, *Ostrea edulis* est une espèce d'huître autochtone des rivages européens. En France, elle est connue sous plusieurs appellations selon les régions de production: pied de cheval (Dunkerque à Tréguier), Belon, Marennes ou Gravette (Arcachon).

II.1.1 L'histoire de l'huître plate en France

L'huître plate a connu une époque glorieuse du temps des Romains. Suite à une exploitation intensive, le parlement de Bretagne a interdit son exploitation en 1755 afin de protéger les stocks. Malheureusement, cette mesure s'est avérée insuffisante et une pénurie d'huîtres fut observée. Afin de palier à cette pénurie, des travaux ont été menés pour tenter de maîtriser l'approvisionnement en juvéniles dans le but de repeupler de nouveaux sites.

Suite aux travaux de Costes et De Bon dans les années 1850 qui portaient sur les techniques de captage de naissain d'huître, l'ostréiculture moderne a vu le jour. Les premières applications des travaux furent réalisées dans le bassin d'Arcachon et ont conduit à l'émergence des premiers parcs de captage du naissain. L'huître plate était alors la seule espèce cultivée en France. À la même époque, le gouvernement autorise l'importation d'huîtres creuses dites « Portugaises », *Crassostrea angulata*. En 1868, l'incident du Morlaisien marqua l'implantation de cette espèce en France. Le Morlaisien, en provenance de Lisbonne et transportant des huîtres creuses s'abrita dans l'estuaire de la Gironde suite à de fortes intempéries. En raison d'un séjour prolongé, la cargaison à bord devint avariée, et fut rejetée dans l'océan dont les huîtres creuses. Ces huîtres s'acclimatèrent et se reproduisirent.

La conchyliculture s'est développée grâce aux premières attributions de concessions sur le domaine public maritime, la production entre l'huître plate et l'huître creuse reste équilibrée au début du XX^{ème} siècle. La production d'huîtres plates était alors développée dans le bassin d'Arcachon, et s'élevait à 20 000 tonnes par an.

En 1920, les huîtres plates ont connu de fortes mortalités encore inexplicées à ce jour. L'huître creuse portugaise la remplaça, étant principalement produite dans le bassin d'Arcachon et dans le sud-est de la France.

Au début des années 60, l'ostréiculture reposait essentiellement sur la production d'huîtres creuses portugaises estimée à 85 000 tonnes, alors que la production d'huîtres plates avoisinait les 30 000 tonnes (FAO 2009).

Entre 1967 et 1973, l'ostréiculture française a dû faire face à une crise de grande ampleur liée à deux maladies infectieuses affectant l'huître creuse portugaise : la première appelée « la maladie des branchies » due à un virus de type iridovirus, puis la seconde également due à un virus de type iridovirus comparable dite « maladie hémocytaire ». Ces deux maladies consécutives sont reconnues comme ayant entraîné la disparition de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* des côtes françaises. Les pouvoirs publics décidèrent alors d'importer une nouvelle espèce d'huître creuse en provenance du Japon et du Canada : *C. gigas*.

Durant cette même période, l'huître plate a connu des premières mortalités dues au parasite *Marteilia refringens* (Comps 1970, Herrbach 1971, Grizel *et al.*, 1974), agent de la marteiliose ou maladie des Abers. En 1979, l'huître plate a subi une seconde vague de mortalités due au parasite *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1979, Comps *et al.*, 1980, Comps 1983). Ces deux maladies ont considérablement affecté la production d'huître plate, la production est alors passée de 20 000 tonnes en 1970 à 2 300 tonnes en 1985 par an (Grizel 1985 ; Gouletquer & Héral 1997), cette production reste similaire de nos jours (Source FAO 2009) (**Figure 5**).

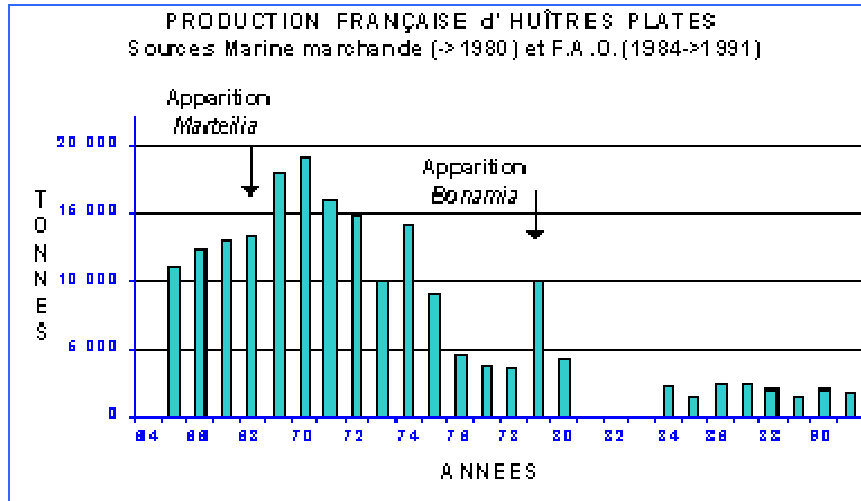


Figure 5 : Historique de la production d'huîtres plates en France (FAO)

Aujourd'hui, la production d'huîtres plates en France se fait essentiellement en Bretagne. Le captage du naissain est réalisé dans la baie de Quiberon (Bretagne sud). Le naissain est majoritairement envoyé pour grossissement à Cancale (Bretagne Nord). En 2001, la production de naissain s'élevait à 375.5 10⁶ unités. La baie de Quiberon assure 87,8% de la production de naissain en France contre 12,2% pour la rade de Brest (Girard *et al.*, 2005). À l'âge de dix mois, une partie du naissain est transférée sur le site de Cancale, principal site de grossissement des huîtres plates avant commercialisation. La Bretagne sud représente la moitié de la commercialisation de l'huître plate, (Girard *et al.*, 2005).

II.1.2 Répartition géographique

L'huître plate, *Ostrea edulis* peuple les côtes européennes de la Norvège à l'Espagne, et notamment le Danemark, l'Allemagne, les Pays-Bas, la Belgique, la Grande-Bretagne, l'Irlande et la France. En Méditerranée, elle est présente en France, Italie, Sicile, mais aussi au Maroc et en Tunisie, et s'étend jusqu'en mer Adriatique et en mer Noire (**Figure 6**) (Jaziri, 1985).



Figure 6 : Distribution géographique de l'huître plate *Ostrea edulis* (d'après Jaziri 1985)

| | | |
|---|---------------|--|
|  | Règne | Animal, Invertébrés |
| | Phylum | Mollusques |
| | Classe | Lamellibranches (Bivalvia) (Linné, 1758) |
| | Ordre | Filibranchia (Woodward, 1892) |
| | Sous-Ordre | Anisomyaria |
| | Super-Famille | Ostreoidea (Rafinesque, 1815) |
| | Famille | Ostreidae (Rafinesque, 1815) |
| | Genre | <i>Ostrea</i> |
| | Espèce | <i>Edulis</i> |

Tableau 1 : Systématique de l'huître plate, *Ostrea edulis*

II.1.3 Systématique

L'huître plate *Ostrea edulis* appartient à la classe des Lamellibranches, à l'ordre des Filibranches, au sous-ordre des Anisomyaires, à la superfamille des Ostréoidés et à la famille des Ostréidés (**Tableau 1**).

Le corps de l'huître se situe à l'intérieur d'une coquille constituée de deux valves, unies par un ligament situé le long de la charnière. Il existe plusieurs classifications des bivalves selon des critères anatomiques et distribution géographique. La forte plasticité morphologique de ces animaux (formes, couleur) rend la classification plus complexe.

Les huîtres sont des animaux métazoaires (organismes pluricellulaires), protostomiens (bouche formée à partir de blastopore), triploblastiques (possédant entre l'ectoderme et l'endoderme un troisième feuillet individualisé, le mésoderme), coelomates (possédant un coelome), hyponeuriens (système nerveux ventral) à symétrie bilatérale. Leur corps est mou et non segmenté.

Le genre *Ostrea* regroupe quarante-trois espèces (Breisch & Kennedy 1980). La répartition du genre *Ostrea* est très large, il est présent dans les eaux chaudes et tempérées et dans tous les océans (Jaziri, 1985).

II.2 Biologie de l'huître plate *Ostrea edulis*

II.2.1 Cycle biologique

L'huître plate est un animal hermaphrodite asynchrone à sexualité consécutive rythmique. Elle est généralement protandrique, mais peut changer de sexe plusieurs fois dans la même saison de ponte. Elle peut être successivement mâle et femelle. La période de reproduction se situe au début du printemps jusqu'à l'automne. L'huître plate est larvipare contrairement à l'huître creuse où la fécondation est externe. La fécondation des ovocytes se situe dans la cavité palléale de l'huître plate. Le mâle libère le sperme dans le milieu et la femelle filtre les gamètes et la fécondation a lieu dans la cavité palléale. Les larves sont incubées huit à dix jours dans la cavité palléale, puis sont libérées dans le milieu à raison d'un million de larves

par ponte en moyenne. Il est possible d'observer des huîtres plates femelles porteuses de larves. On parle d'huîtres ardoisées. Les larves émises mesurent 160 µm environ. La durée de la phase planctonique des larves véligères est fonction de la température : de cinq jours dans les eaux à 26°C, jusqu'à 14 jours à 17°C. La vie pélagique de ces larves pédivéligères dure encore dix jours, au terme desquels elles se fixent sur un support (280 à 300 µm). Les juvéniles sont capables de se reproduire dès le premier été. Le cycle de reproduction de l'huître plate est résumé sur la **Figure 7**.

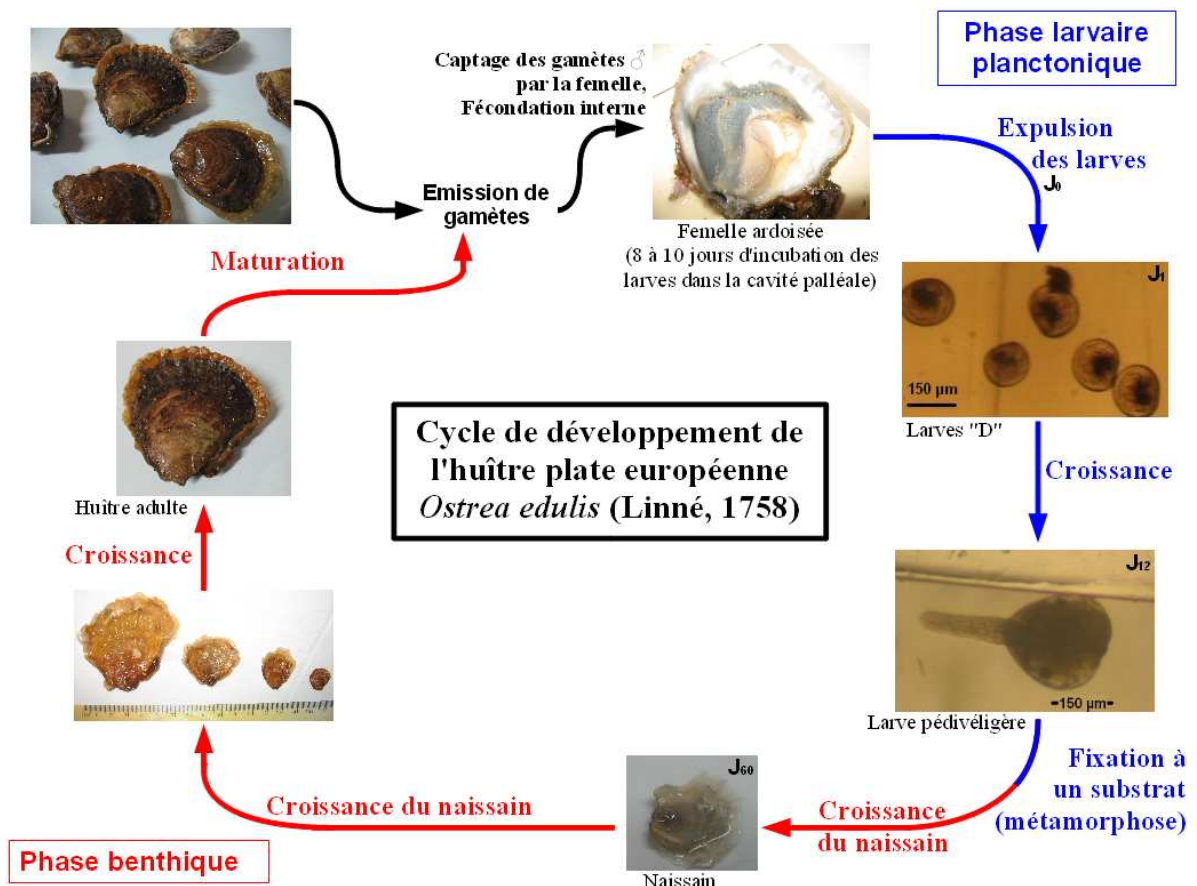


Figure 7 : Cycle de reproduction de l'huître plate *Ostrea edulis* (com. Per. Estelle Harrang) (Photos Estelle Harrang)

II.2.2 Ecologie de l'huître plate

L'huître plate vit immergée jusqu'à des fonds de 40 m ou dans le domaine intertidal (zone de balancement des marées) à l'étage infralittoral (coefficient de 90-110). En élevage, elle peut être cultivée sur des parcs découvrant seulement aux marées de vives-eaux par des coefficients supérieurs à 60 ou dans des étangs salés. Les adultes peuvent vivre fixés sur des substrats durs (roches, débris coquilliers), mais aussi sur des substrats meubles de type sablo-vaseux. L'huître plate vit dans des eaux plus salines que l'huître creuse. Elle ne prolifère pas dans les eaux estuariennes, car la turbidité y est trop importante.

L'huître plate comme toutes les autres huîtres sont des filtreurs microphages. Elles s'alimentent en se nourrissant de particules inférieures à 4 μm (bactéries, phytoplancton) ou par absorption de substances organiques dissoutes dans l'eau de mer. L'huître peut filtrer des dizaines de litres d'eau par jour.



Figure 8 : Filets tubulaires avec des coquilles de moules utilisées comme collecteurs de naissain (source FAO)

II.2.3 Techniques d'élevage de l'huître plate

II.2.3.1 Captage de naissain naturel

La culture de l'huître plate repose surtout sur l'utilisation des collecteurs de naissain et l'obtention de juvéniles sauvages. Les collecteurs de naissain utilisés sont des filets en tubes remplis de coquilles de moules, puis mis en suspension (**Figure 8**). Ils sont implantés au printemps dans des eaux peu profondes. D'autres supports de fixation peuvent être utilisés tels que des tuiles chaulées, des ardoises, des broches de coquilles St Jacques, des tubes en PVC, des lamelles ou coupelles en PVC. Ces supports sont placés dans les zones intertidales.

II.2.3.2 Production de naissain en éclosion

La production de naissain en éclosion est faible voir inexistante. Cette faible production s'explique par deux raisons majeures : la complexité de la production et une faible demande de la profession. L'élevage en éclosion nécessite la production de microalgues. Les espèces normalement utilisées sont des flagellés combinés avec des diatomées pour fournir un régime bien équilibré et pouvoir faciliter la gamétogenèse et le développement larvaire. La quantité de nourriture dépend de la densité larvaire. Cette production était assurée par trois structures situées en Bretagne sud, Poitou-Charentes et Méditerranée.

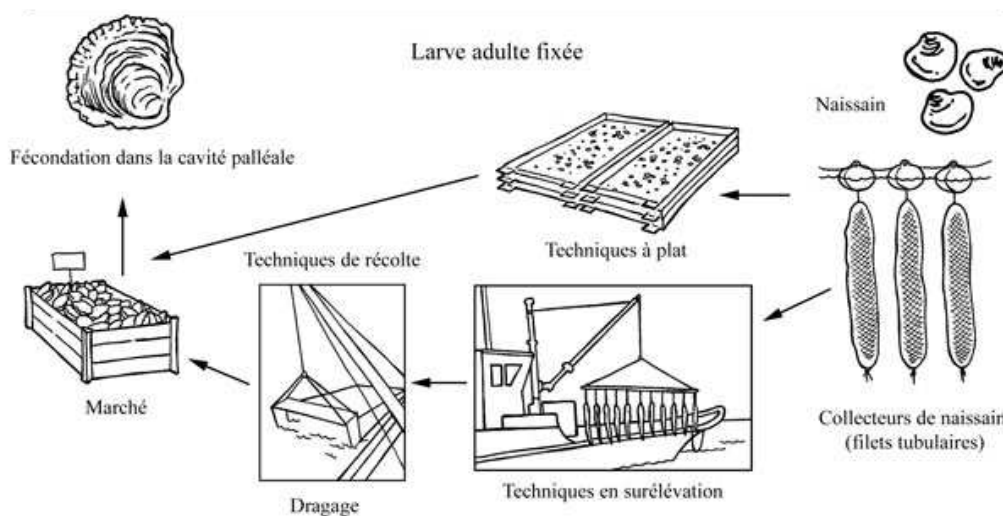


Figure 9 : Zootechnie de l'huître plate (source FAO)

II.2.3.3 Grossissement

Deux principales techniques de production sont utilisées pour produire des huîtres plates : en surélévation et à plat.

Le grossissement en surélévation consiste à utiliser des plateaux flottants ou radeaux, filières, cordes suspendues, lanternes ou paniers en plastique suspendus sur des radeaux, tables basses intertidales et poches d'huîtres (**Figure 9**).

Dans le grossissement à plat, le naissain est directement semé par bateau sur un fond sub-tidal à une densité de 50-100kg/ha, cinq à dix fois moins que les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*). La taille commune au repeuplement, qui est réalisé en mai-juin, est de 1 cm (après 1 an environ). La culture en eau profonde maximise le taux de croissance depuis que la bonamiose a fortement réduit le taux de survie des huîtres de trois-quatre ans. Les huîtres de deux ans (60-80 g) sont récoltées par dragage avant que la maladie n'induisse des mortalités. Les huîtres sont habituellement récoltées par dragage. Malgré cette pêche précoce les taux de survie restent faibles, environ cinq pour cent après un cycle de trois années d'élevage (**Figure 9**).

II.3 Les hémocytes, cellules aux multiples fonctions

II.3.1 Différent types hémocytaires

Les hémocytes sont véhiculés par l'hémolymphe dans un système circulatoire semi-ouvert (Cheng, 1981). Ils peuvent occuper différentes localisations dans le système circulatoire (vaisseaux et sinus), mais sont également présents dans tous les tissus et organes.

L'origine des hémocytes n'est pas clairement définie, l'absence de multiplication des hémocytes circulant laisse suspecter l'existence d'un ou plusieurs sites d'hématopoïèse chez l'huître. Il est généralement décrit que les hémocytes circulants proviennent d'une différenciation de cellules dans le tissu conjonctif. Plusieurs modèles d'ontogénèse hémocytaire ont été proposés notamment par Cheng (1981) et Mix (1976) (**Figure 10 et 11**).

Différents types d'hémocytes ont été différenciés sur la base de critères morphologiques, cytochimiques, fonctionnels et moléculaires (Xue, 1998). Cheng (1981) et Fisher (1986) ont établi deux grandes catégories cellulaires en se basant sur les critères morphologiques tels que la taille, la forme, le rapport nucléocytoplasmique, l'affinité tinctoriale et la présence d'organites cellulaires.

Les deux grandes catégories cellulaires sont :

-Les hémocytes granuleux qui présentent un petit noyau et un large cytoplasme caractérisé par de nombreuses granulations. Leur rapport nucléocytoplasmique est faible (**Figure 12**). Les granules peuvent présenter différentes formes, tailles et affinités tinctoriales (Hine, 1999).

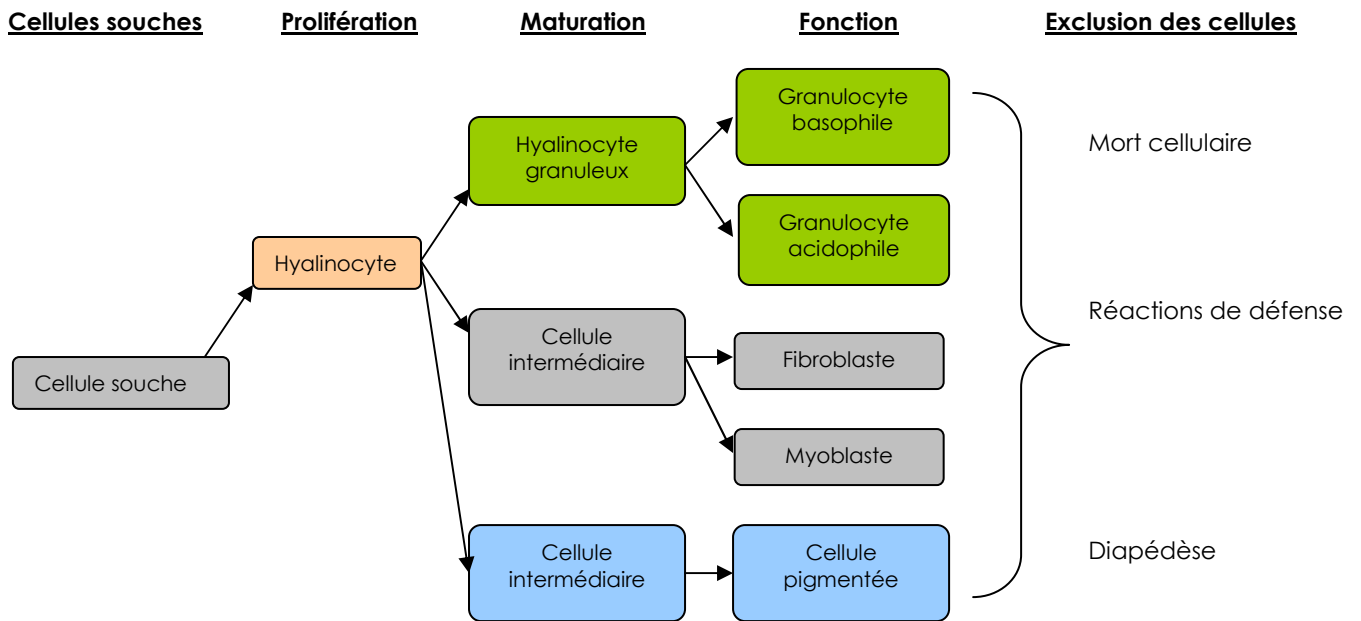


Figure 10 : modèle général d'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves proposé par Mix (1976)

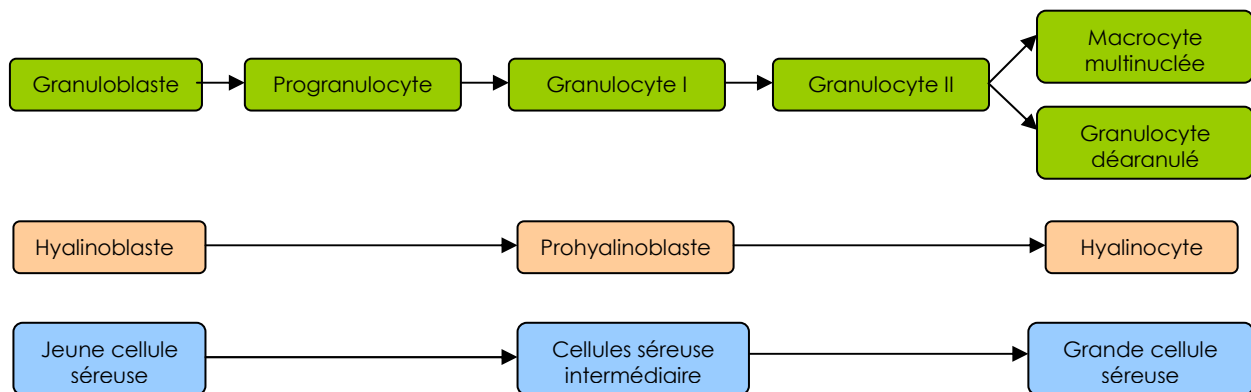


Figure 11 : modèle général d'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves proposé par Cheng (1981)

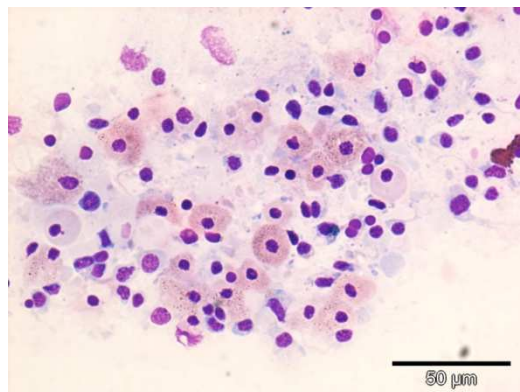


Figure 12 : Hémocytes chez l'huître plate *Ostrea edulis* colorés à Hémacolor®

-Les hémocytes agranuleux, également appelés hyalinocytes, qui présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. La cellule contient peu ou pas de granulations. Les hémocytes agranuleux peuvent être divisés en deux sous catégories en fonction de leur taille, les grands et les petits hyalinocytes (**Figure 12**). Sur la base des critères morphologiques, l'huître plate, *Ostrea edulis*, possède un type de granulocytes et deux types de hyalinocytes (grand et petit) (Chagot, 1989 ; Auffret, 1989 ; Chagot *et al.*, 1992 ; Mourton *et al.*, 1992). Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* il a été mis en évidence trois types de granulocytes et deux types de hyalinocytes (Chagot, 1989 ; Auffret, 1989 ; Chagot *et al.*, 1992 et Mourton *et al.*, 1992). Chez les pectinidés, une étude a révélé l'absence de granulocyte chez le pétoncle *Chlamys varia* et la coquille Saint-Jacques, *Pecten Maximus* (Auffret, 1985). Certains auteurs ont utilisé d'autres critères comme les critères fonctionnels (présence d'activités enzymatiques). Les critères fonctionnels ont permis de séparer différents types cellulaires chez la palourde *Ruditapes philippinarum*. Les granulocytes et les hyalinocytes possèdent certaines enzymes en commun (phosphatase alcaline, estérases non spécifiques, peroxydase et cytochrome c oxydase) alors que certaines activités ne sont détectées que dans les granulocytes (β -glucoronidase, estérase acide et arylsulphatase) (Cima *et al.*, 2000).

II.3.2 Propriétés des hémocytes

Les hémocytes possèdent de nombreuses propriétés : agrégation hémocytaire, adhésion, plasticité, mobilité et chimiotactisme.

-L'agrégation hémocytaire

Les hémocytes peuvent s'agréger. Cette agrégation est dite spontanée si elle a lieu suite à un stress en l'absence d'agents infectieux. L'agrégation peut également survenir suite à une infection. Ce phénomène permet l'immobilisation de l'agent infectieux, puis sa dégradation. La formation d'amas hémocytaires suite à l'agrégation hémocytaire peut se rapprocher du phénomène de coagulation sanguine chez les vertébrés. Cependant, les amas hémocytaires peuvent se dissocier à l'inverse de la coagulation sanguine chez les vertébrés. Les hémocytes dissociés peuvent ensuite retourner dans le système circulatoire (Feng, 1988).

L'agrégation hémocytaire peut être diminuée en plaçant l'hémolymphe sur glace (4°C) ou par l'ajout de substances (EDTA et caféine) qui inhibent l'agrégation (Cheng & Bayne, 1995a), (Auffret & Oubella, 1997). Chen & Bayne, 1995a rapportent aussi que l'ajout de la cytochalasine B dans l'hémolymphe de *Mytilus californianus* inhibe aussi l'agrégation hémocytaire du fait de l'implication du cytosquelette dans le processus d'agrégation hémocytaire.

-Adhésion

L'adhésion hémocytaire correspond à une interaction entre les cellules et des substrats. Les substrats correspondent à des molécules présentes dans le milieu extérieur. Ces substrats peuvent être des récepteurs présents à la surface d'autres particules (agents infectieux) ou bien des protéines solubles libres dans le milieu jouant le rôle d'opsonine. Les molécules intervenant dans l'adhésion peuvent être de type carbohydrates, sucres présents à la surface des hémocytes (cf. Partie 1 § II.4.1.3.2).

-La plasticité

La forme des hémocytes circulant chez les mollusques est généralement sphérique (Sminia *et al.*, 1983 ; Hinsch & Hunte, 1990). C'est le cas chez *Ostrea edulis* (**Figure 13**). Cependant, les hémocytes fraîchement prélevés mis sur une surface plane ont tendance à s'étaler. Ils prennent une forme amiboïde et émettent des filipodes (**Figure 13**). L'étalement des hémocytes peut être inhibé par l'EDTA ou par un milieu ne contenant pas de Ca^{2+} et de Mg^{2+} .

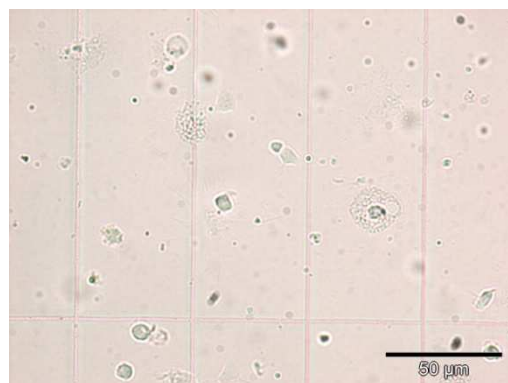


Figure 13 : Hémocytes d'huître plate *Ostrea edulis* fraîchement extraits et observés sur cellule de Malassez (x 400) (Photo B. Chollet)

Par ailleurs, dans les cas de néoplasie, les hémocytes perdent cette plasticité et leur capacité de s'étaler. Beckman *et al.*, (1992) ont montré que les hémocytes ayant perdu la capacité de s'étaler perdent aussi certaines fonctions telle que la phagocytose.

-Mobilité

Après étalement, les hémocytes peuvent présenter la capacité de se déplacer. Cette capacité de déplacement repose sur la formation de pseudopodes. Cheng & Howland (1982) ont montré que chez *Crassostrea virginica* le traitement des hémocytes avec la cytochalasine B inhibait la production de microfilaments.

-Chimiotactisme

L'orientation du déplacement des hémocytes est nécessaire dans le processus de défense, notamment pour la localisation et la capture des particules étrangères. Les hémocytes de mollusque peuvent être attirés chimiquement par des substances produites par des organismes étrangers ou par les organismes eux-mêmes.

Le chimiotactisme entre bactéries et hémocytes a été montré chez *Crassostrea virginica* (Cheng & Rudo, 1976 ; Cheng & Howland, 1979, 1982), *Mytilus edulis* (Scheeweib & Renwarantz, 1993).

II.3.3 Fonctions des hémocytes

Les hémocytes sont impliqués dans de nombreux processus vitaux comme les réactions de défense, la réparation de lésions ou la réparation de la coquille (Mount *et al.*, 2004), la digestion et le transport de nutriments, la respiration ainsi que l'excrétion (Feng, 1988 ; Cheng, 1996). Ces fonctions reposent presque toutes sur les capacités de recrutement des hémocytes vers les sites d'infection ou de lésion, où ils s'agrègent pour restreindre l'infection ou la lésion et y transportent des éléments essentiels (calcium pour la réparation de la coquille, nutriments et les molécules de défense). Leur capacité de phagocytose est aussi une des fonctions essentielles pour éliminer des éléments endogènes (cellules mortes, lésées) ou exogènes (agents infectieux, nourriture).

II.4 Les mécanismes de défense chez les mollusques bivalves

Les mollusques bivalves (huîtres) comme les autres invertébrés sont considérés comme dépourvus d'une immunité acquise reposant sur des cellules « mémoire ». Cependant, l'absence de réponse immunitaire spécifique et de mémoire chez les invertébrés est aujourd'hui remise en question (Schmid-Hempel, 2005 ; Rowley & Powel, 2007 ; Schulenburg *et al.*, 2007).

Les huîtres ne produisent pas d'anticorps suite à une infection. Les mécanismes de défense chez les huîtres reposent sur l'immunité dite « innée » ou non spécifique. Les barrières anatomiques et chimiques constituent les premières lignes de défense contre l'invasion d'agents infectieux. Ces premières lignes de défense sont la coquille, le manteau, les branchies et le mucus. La seconde ligne de défense est assurée par les composants présents dans l'hémolymphe notamment les substances dissoutes dans l'hémolymphe et les hémocytes (Roch, 1999 ; Chu, 2000 ; Xue & Renault, 2001 ; Bachère *et al.*, 2004). Les hémocytes sont les cellules effectrices de l'immunité chez les bivalves. Le processus de défense immunitaire repose essentiellement sur la phagocytose.

II.4.1 Mécanismes à médiation cellulaire

II.4.1.1 Infiltration hémocytaire

L'infiltration hémocytaire est la réponse cellulaire immédiate suite à une infection, à un dommage causé par des substances toxiques ou une blessure. L'hémocytose est le principal processus impliqué dans l'infiltration hémocytaire. L'hémocytose correspond à une élévation de la densité hémocytaire dans le système circulatoire. Les hémocytes sont ensuite véhiculés par l'hémolymphe vers le site à « réparer ». L'hémocytose peut être considérée comme une étape préliminaire au processus d'encapsulation ou de phagocytose. Anderson *et al.*, (1995) indique chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, une augmentation de la densité des hémocytes lors de l'infection par le parasite *Perkinsus marinus*. La détection de *Bonamia ostreae*

sur coupe histologique chez *Ostrea edulis* est associée fréquemment à une infiltration hémocytaire sur le site d'infection (**Figure 14**).

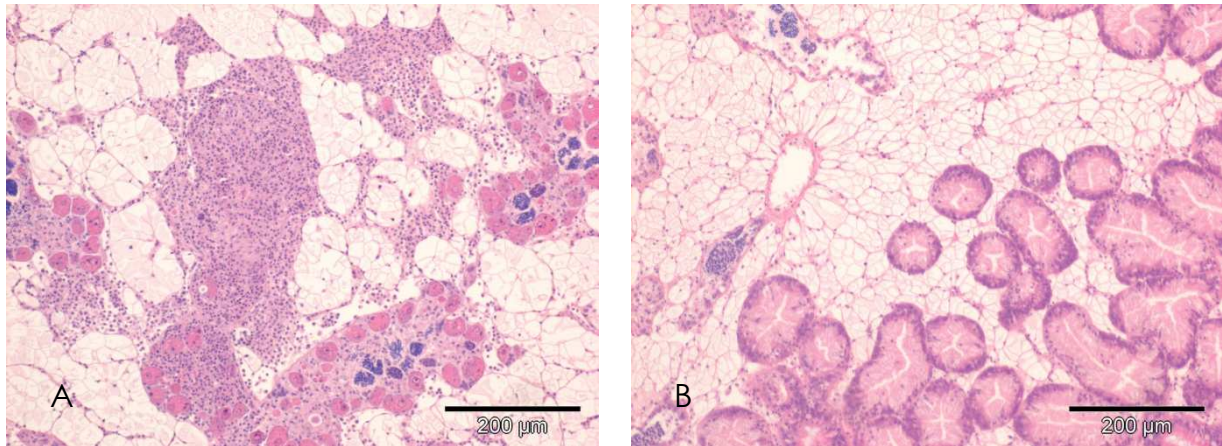


Figure 14 : (A) Coupe histologique illustrant une infiltration hémocytaire chez *Ostrea edulis* associée à l'infection par le parasite *Bonamia ostreae* (x 100). (B) Coupe histologique d'une huître plate saine sans infiltration hémocytaire (x 100). (Photos B. Chollet)

II.4.1.2 Encapsulation

Le processus d'encapsulation intervient lorsqu'une particule est trop volumineuse pour être phagocytée (**Figure 15**). Différentes étapes ont été décrites lors de l'encapsulation des helminthes chez les mollusques (Cheng & Rifkin, 1970). Les hémocytes sont véhiculés par l'hémolymphe sur le site de l'infection puis ils infiltrent les tissus infectés pour se différencier en cellules de type fibroblastique. Ces cellules produisent des fibres qui interviennent dans le processus d'encapsulation en formant une capsule fine autour du parasite. Ce phénomène a été observé chez la moule *Mytilus edulis*, infectée par un procaryote de type rickettsien (Gulka & Chang, 1984).

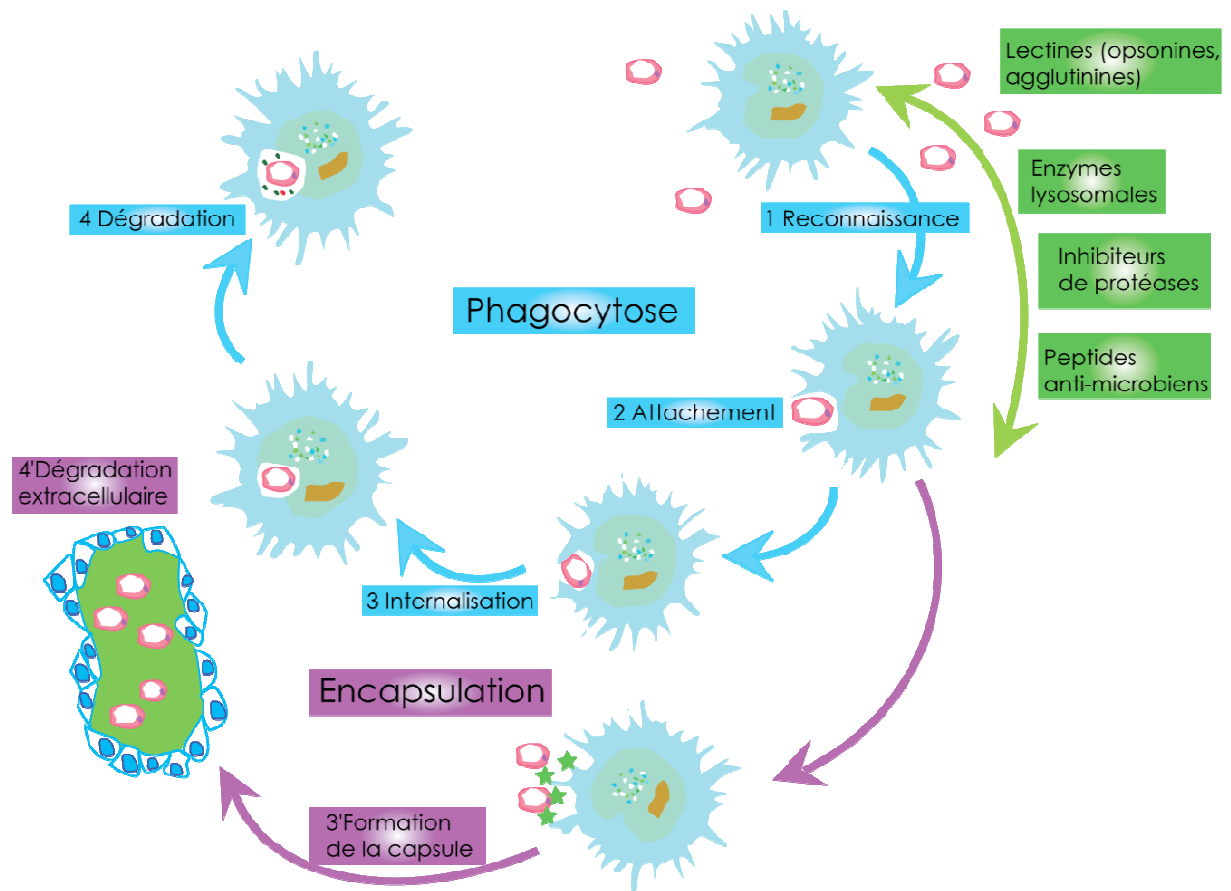


Figure 15 : Mécanisme général de la phagocytose et de l'encapsulation

II.4.1.3 Phagocytose

II.4.1.3.1 Processus de la phagocytose

La phagocytose est un processus visant à éliminer les corps étrangers tels que bactéries, protozoaires, et virus. Ce processus peut se décomposer en quatre étapes principales (Auffret, 1985 ; Cheng, 1981 ; Fisher, 1986) (**Figure 15**).

1. Reconnaissance: la rencontre entre les hémocytes et les particules étrangères peut se produire passivement ou activement par chimiotactisme. Les hémocytes sont alors dirigés vers la particule à phagocyter. Cette reconnaissance se fait grâce à des récepteurs et des lectines (**Figure 15**).

2. Attachement: les particules se fixent sur la membrane externe avant d'être internalisées (**Figure 15**).

3. Internalisation: l'internalisation est réalisée par la formation d'un phagosome qui résulte d'un enroulement de la membrane externe de l'hémocyte. Le phagosome fusionne avec les lysosomes afin de former un phagolysosome. Lors de cette formation, le lysosome libère les enzymes lysosomales dans le phagosome (**Figure 15**).

4. Destruction des particules et exclusion des particules: La destruction des particules repose sur les enzymes lysosomiales et par la formation d'espèces oxygénées réactives. Les particules sont dégradées, puis excrétées par exocytose (**Figure 15**).

II.4.1.3.2 Reconnaissance, attachement et voies de signalisation

La reconnaissance des particules étrangères fait intervenir des récepteurs membranaires capables de reconnaître des motifs présents sur la cellule cible (Humphries & Yoshino, 2003 ; Vasta, 2009). Chez les mollusques, des molécules de reconnaissance ont été identifiées comme les lectines, les protéines de liaison au LPS (lipopolysaccharides), mais peu de récepteurs ont été identifiés.

a) Lectines

Les lectines sont des glycoprotéines produites par les hémocytes capables de se lier à la surface des microorganismes. Ces lectines peuvent intervenir comme récepteur dans la reconnaissance des motifs présents sur les algues ou sur les agents infectieux (bactéries, parasites) (Tasumi & Vasta, 2007 ; Wang *et al.*, 2008). Les lectines jouent un rôle clé dans la phagocytose, car elles permettent l'agglutination des microorganismes et facilitent la liaison entre les deux cellules par leur rôle opsonisant. Les lectines peuvent être membranaires, mais aussi extracellulaires sous forme soluble dans l'hémolymphe. Deux grandes classes de lectines ont été rapportées chez les mollusques, les galectines et les lectines de type C (Vasta *et al.*, 1994 ; Vasta & Ahmed, 1996 ; Vasta, 2009).

Les galectines forment un groupe de lectines animales caractérisées par leur spécificité pour les sucres de type α -galactosides (Cooper & Barondes, 1999). Il existe plusieurs types de galectines, classées en fonction de leur structure allant de polypeptides contenant un « coding region domain » (CRD) pouvant former des homodimères ou des monomères et des polypeptides pouvant contenir des tandem repeat CRD. Chez les vertébrés, les galectines pourraient être impliquées dans une variété de processus cellulaires déterminant le destin de la cellule, l'interaction entre les cellules, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Rabinovich & Gruppi, 2005).

Une lectine de type galectine a été identifiée chez *Crassostrea virginica* associée à une infection par le parasite *Perkinsus marinus* (Tasumi & Vasta, 2007). Ces auteurs suggèrent que la galectine intervient dans l'entrée du parasite dans la cellule hôte.

Les lectines de type C sont des lectines dépendantes du calcium (Ca^{2+}). Elles sont toutes caractérisées par la présence d'un site de reconnaissance situé dans un domaine extracellulaire. Plusieurs types de lectines C ont été identifiés, les lectines endocytiques, les collectines, les ficolines et les sélectines.

Les lectines endocytiques sont des protéines trans-membranaires de type II (N-terminal cytoplasmique et CRD sur le segment C-terminal extracellulaire). Les collectines sont des protéines solubles composées d'un domaine N-terminal riche en cystéine et d'un CRD au C-terminal. Les sélectines sont au nombre de trois (type E (endothéliales), P (plaquettaires) et I (leucocytaires)), ce sont des protéines transmembranaires de type I comportant un C-terminal cytoplasmique et le CRD situé dans le domaine externe N-terminal. Les sélectines de type E jouent un rôle important dans le recrutement des leucocytes au site de la lésion chez les vertébrés. Ce recrutement provoque la libération locale de cytokines IL-1 et le TNF induit par les cellules endommagées de la sur-expression de la E-sélectine sur des cellules endothéliales.

Chez les invertébrés, une sélectine a été clonée chez *Biomphalaria glabrata*, elle correspond à une protéine de masse moléculaire apparente de 36-kDa (BgSel). La partie C-terminale de la protéine montre un domaine lectine putatif. La protéine BgSel a pu être détectée par immunocytochimie au niveau des hémocytes et dans les cellules embryonnaires de *B. glabrata*, mais la fonction de cette sélectine reste encore à déterminer (Duclermortier *et al.*, 1999).

Chez les vertébrés, les ficolines et « Manose-Binding Lectin » (MBL) sont des récepteurs de reconnaissance des agents infectieux. Les ficolines activent plusieurs serines protéases MASPs « MBL- Associated Serines Protéases », qui sont capables de cliver des composants de la cascade du complément (Fujita *et al.*, 2004). La MBL et la ficoline sont des oligomères constitués par des sous-unités structurales identiques, chaque sous-unité est composée respectivement de trois polypeptides de 32kDa et 35 kDa respectivement. MBL et ficoline contiennent une région N- terminale riche en cystéines, un domaine collagène putatif, cependant MBL montre un domaine CRD « Carbohydrate Recognition Domain » dans son domaine C-terminal. L'extrémité C-terminale de type ficoline a un domaine similaire au fibrinogène « Fibrinogen-like

domain »). Les MBL se lient donc à la surface des agents infectieux pour limiter l'invasion.

Il a été identifié des ESTs BQ426875 codant pour des ficolines chez *Crassostrea gigas*, mais leur caractérisation n'a pas été précisée (Gueguen *et al.*, 2003). Enfin, deux autres types de lectines (gigalin-E et H) ont été caractérisés chez *C. gigas* possédant des propriétés d'agglutination de bactéries de l'espèce *Vibrio anguillarum*. Les gigalines possèdent une activité opsonisante accrue *in vivo* en réponse à des injections bactériennes suggérant son implication dans l'élimination des micro-organismes (Olafsen *et al.*, 1992).

Chez la palourde *Ruditapes philippinarum*, il a été identifié une EST codant pour une lectine de type C. Cette séquence a été identifiée en présence du parasite *Perkinsus olseni* (Kang *et al.*, 2006). Chez l'ormeau *Haliotis diversicolor*, une lectine de type C a été identifiée, son expression étant induite par la présence de *Vibrio alginolyticus* (Wang *et al.*, 2008). Chez le pétoncle, *Chlamys farreri*, une lectine de type C a été identifiée. Cette lectine contient trois CRDs (Carbohydrate-Recognition Domains). La Cflec-3 est sur-exprimée après 8h et 16h d'exposition à *Listonella anguillarum*.

b) Protéines de liaison au LPS

Les protéines de liaison au LPS ont été identifiées notamment chez *Crassostrea gigas* avec la caractérisation de Cg-LBP (*C. gigas* LPS-binding protein) (Gonzalez, 2005) et Cg-BPI (*C. gigas* Bacterial Permeability Increasing protein) (Gonzalez *et al.*, 2007). La protéine BPI est produite par les granules des cellules immunitaires à action microbicide. L'expression de ce gène est induite en réponse à une stimulation bactérienne (Gonzalez *et al.*, 2007).

Les LBP sont des protéines plasmatiques qui peuvent reconnaître spécifiquement les LPS des bactéries Gram négative, et signaler leur présence par un récepteur membranaire (CD14 chez les mammifères). Le récepteur membranaire CD14 transcrit le signal via son interaction avec le Toll like receptor 4 ou TLR4 chez les mammifères. L'activation de ces molécules de reconnaissance conduit à la

mobilisation des voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire. Plusieurs voies de signalisations sont possibles : la voie NF- κ B qui régule plusieurs gènes intervenant dans la réponse immunitaire (Escoubas *et al.*, 1999 ; Montagnani *et al.*, 2004) (**Figure 16**). Certains composés de la voie NF- κ B ont été caractérisés chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Gueguen *et al.*, 2003).

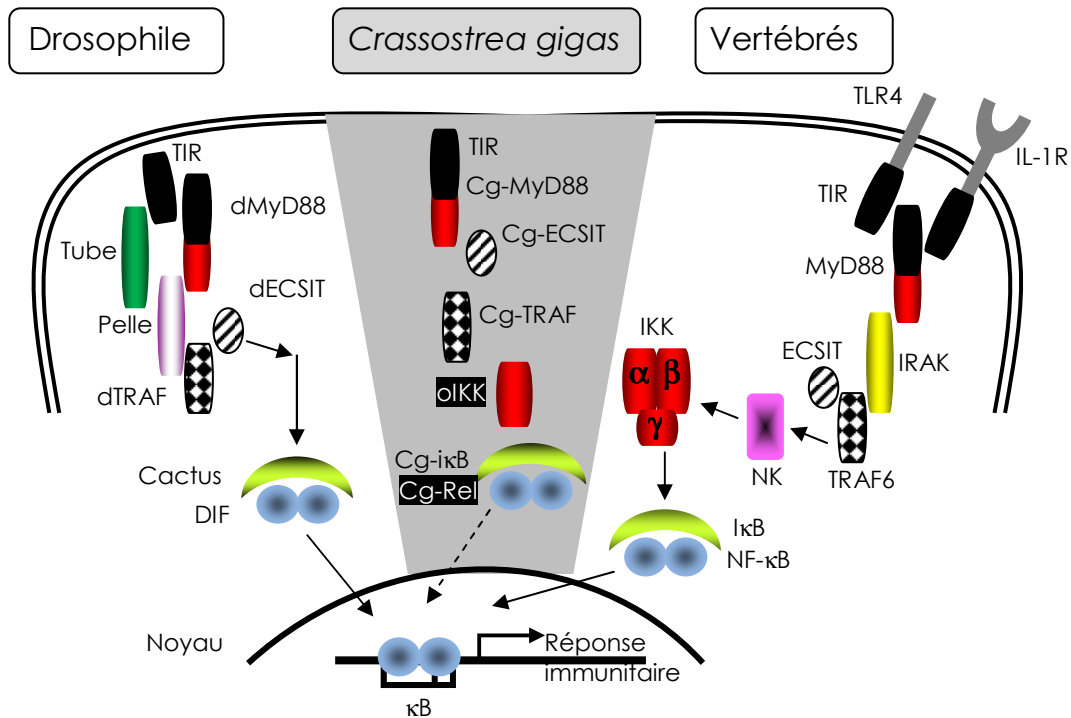


Figure 16 : Conservation de la voie NF- κ B chez les vertébrés, la drosophile et chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Modifié d'après Montagnani *et al.*, 2004)

c) Voie Toll like recepteur

L'identification d'un Toll like receptor chez *Chlamys farreri* laisse suspecter la présence de ce type de récepteur chez les mollusques marins, en revanche la fonction et l'implication dans la reconnaissance des agents infectieux n'a pas été encore précisée (Qui *et al.*, 2007).

d) Voie MAP Kinase

La voie des MAP Kinases (Mitogen-activated kinases) a été caractérisée chez *Littorina littorea* (Lakovleva *et al.*, 2006) et *Biomphalaria glabrata* (Humphries &

Yoshino, 2006). La voie de signalisation décrite chez *B. glabrata* a été identifiée en réponse de l'ajout de PMA qui a abouti à la régulation de production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une précédente étude menée par Zelchik *et al.*, (2007) a montré que la transduction du signal menant à la phagocytose, à l'activation de la production d'EOR et à l'encapsulation du parasite *Schistosoma mansoni*, passait par la voie des MAP Kinase.

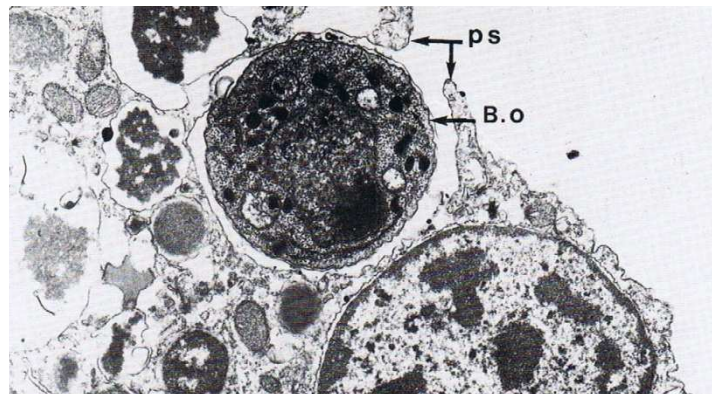


Figure 17 : Internalisation du parasite *Bonamia ostreae* par un hémocyte d'huître plate *Ostrea edulis* (ps : pseudopodes, B.o : *Bonamia ostreae*) Microscopie électronique x 20000 JEOL JEM 1200 EX (Chagot, 1989).

II.4.1.3.3 Internalisation

Après l'étape de reconnaissance et d'adhésion, l'internalisation de particules étrangères fait intervenir des phénomènes de remaniement du cytosquelette. L'internalisation de particules étrangères peut être suivie par l'ajout de particules colorées (billes de latex fluorescentes, encres, bactéries mutées GFP ou particules étrangères de type zymosan, érythrocytes de vertébrés). L'internalisation commence immédiatement après la phase d'adhésion entre la particule étrangère et la cellule effectrice (Cheng *et al.*, 1975 ; Cheng, 1983 ; Alvarez *et al.*, 1989). Le processus d'internalisation de particules n'est pas complètement élucidé à ce jour. Trois modèles d'internalisation ont été proposés par Cheng (1981). Dans le premier modèle, les particules étrangères seraient attachées à la surface des hémocytes au niveau des filipodes, englobées dans le cytoplasme, puis dans le phagosome. Dans le second modèle proposé, les particules seraient attachées à la surface des

hémocytes, puis englobées dans des vacuoles d'endocytose par des invaginations de la surface cellulaire, sans prolongement cellulaire de type filopodes. Dans le troisième modèle proposé, les particules entreraient dans le phagosome par l'intermédiaire de pseudopodes « zippering ». Les images en microscopie électronique obtenues suite à une mise en contact entre des hémocytes de l'huître plate *Ostrea edulis* et du parasite *Bonamia ostreae* laissent penser que le parasite *B. ostreae* utiliserait ce dernier modèle proposé afin de pénétrer dans les hémocytes (Chagot, 1989 ; Bachère *et al.*, 1992, Mourton *et al.*, 1992) (**Figure 17**).

II.4.1.3.4 Dégradation des particules internalisées

La dégradation des particules étrangères s'effectue à l'intérieur du phagolysosome après internalisation. La destruction des particules étrangères est assurée par (1) un mécanisme faisant intervenir des espèces oxygénées réactives (EOR) et/ou (2) un mécanisme faisant intervenir les enzymes lysosomiales (Bachère *et al.*, 1995 ; Roch, 1999 ; Chu, 2000) (**Figure 18**).

(1) La production d'EOR, ROS (Reactive Oxygen Species) ou ROI (Reactive Oxygen Intermediate) est décrite chez les vertébrés et chez les invertébrés. La formation d'espèces oxygénées réactives est dépendante de l'oxygène (« flambée oxydative » ou « respiratory burst »). Les espèces formées sont le radical anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxydes (OH^-) et l'anion hypochloride (OCl^-) (Toreilles *et al.*, 1996). La formation de ces espèces est initiée par l'attachement des particules à la périphérie de la membrane cytoplasmique. Ceci active par la suite une activité enzymatique NADPH-oxydase catalysant la réduction univalente de l'oxygène moléculaire en O_2^- . La formation de ces radicaux contribue à une augmentation de la consommation en O_2 . Les ions O_2^- peuvent être transformés en peroxyde d'hydrogène sous l'action catalytique d'une superoxyde dismutase (SOD). L'excès d' H_2O_2 peut être réduit en H_2O et O_2 sous l'action d'une catalase ou transformé en acide hypochloreux (HOCl) par une myelopéroxydase.

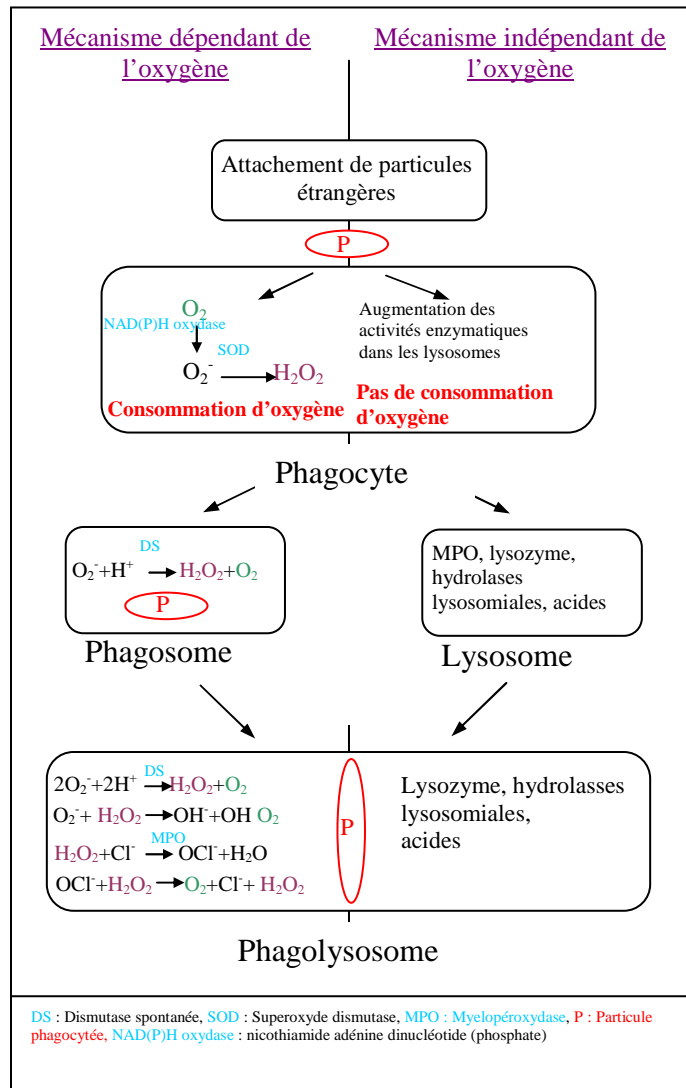


Figure 18 : Mécanisme de dégradation des particules phagocytées (d'après Xue, 1998)

La production d'EOR peut être stimulée par l'ajout de zymosan ou de solution soluble comme le PMA (Phorbol Myristate Acétate) (Toreilles *et al.*, 1996). La présence d'espèces oxygénées réactives a été étudiée par différentes méthodes chez différents bivalves, dont *Ostrea edulis* (Chagot, 1989, ; Bachère *et al.*, 1991, Xue *et al.*, 2001), *Crassostrea gigas* (Bachère *et al.*, 1991 Lambert *et al.*, 2003, Goedken & De Guise, 2004), *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997) et *Mytilus edulis* (Pipe, 1990a, 1992).

La production des EORs peut devenir très toxique pour la cellule hôte. Il existe donc des enzymes capables de détruire les EORs produites en excès dans la cellule. Les systèmes enzymatiques mis en place sont les superoxydes dismutases (SOD), peroxydases ou catalases. Les enzymes de type SOD permettent la dismutation des ions O_2^- en H_2O_2 . La catalase et la glutathion peroxydase (GPX) qui réduisent l' H_2O_2 en H_2O , la glutathion réductase (GRED) qui régénèrent le glutathion réduit (GSH). La GST (Glutathion S Transférase) catalyse la conjugaison du GSH, la glyoxalase et des composés piègeurs de radicaux de faible poids moléculaire (vitamines A, C et E, caroténoïdes, etc) (Toreilles *et al.*, 1996). Tous ces systèmes antioxydants ont été identifiés chez différents bivalves comme *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis* (Pipe *et al.*, 1993 ; Livingstones *et al.*, 1992 ; Porte *et al.*, 1991).

(2) Le second mécanisme intervenant dans la dégradation des particules étrangères repose sur la libération des enzymes lysosomiales. Ces enzymes sont contenues dans les lysosomes, puis libérées dans le phagosome lors de la fusion du lysosome et du phagosome formant alors le phagolysosome (**Figure 18**) (Cheng, 1981). Les enzymes contenues dans les lysosomes sont des enzymes de type hydrolases. L'effet hydrolytique de ces enzymes joue un rôle important dans la dégradation des agents infectieux chez les bivalves marins (Xue & Renault 2000). La fonction et la nature de ces enzymes hydrolytiques sont détaillées dans la partie 1 §II.4.2.1.

En complément de ces deux processus impliqués dans la dégradation des particules étrangères, il existe un autre système de dégradation, le système nitrite oxyde (NO) présent dans la cellule phagocytaire et dans l'hémolymphe. La synthèse de NO a

été identifiée chez les mollusques bivalves. Le système de production de nitrite oxyde synthétase et détaillé dans la partie 1 §II.4.2.4.

II.4.1.3.5 Devenir des particules étrangères phagocytées dans les hémocytes

Les particules étrangères sont détruites après phagocytose. Une étude effectuée chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* a permis de décrire l'évolution des matériaux phagocytés dans les phagolysosomes (Cheng, 1981). Pendant le processus de dégradation de l'organisme phagocyté, un grand nombre de granules de glycogène s'accumulent dans le phagolysosome. Les granules de glycogène sont libérés dans le cytoplasme suite à une rupture de la membrane du phagolysosome. Ces granules sortent de la cellule par l'intermédiaire de vésicules. Ces vésicules se retrouvent alors dans l'hémolymphe où la membrane contenant du glycogène peut être détruite et le glycogène dégradé en glucose. Auffret (1985) et Carballal *et al.*, (1997) ont respectivement décrit ce même processus chez l'huître plate *Ostrea edulis* et chez la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Malgré l'existence de ces processus de dégradation certains agents infectieux (virus, bactéries ou protozoaires) internalisés peuvent éviter, inhiber ou résister à ces mécanismes de destruction ce qui leur permet de s'installer dans la cellule hôte afin de s'y multiplier. Notamment plusieurs parasites de mollusque bivalves résistent à la destruction après phagocytose. C'est le cas du parasite *Bonamia ostreae* chez l'huître plate *Ostrea edulis* (Grizel *et al.*, 1988 ; Chagot, 1989 ; Chagot *et al.*, 1992 ; Mourton *et al.*, 1992 ; Xue, 1999 ; Cochenec, 2001), de *Bonamia sp.* chez l'huître plate *Ostrea chilensis* (Dinamani *et al.*, 1987 ; Doonan *et al.*, 1994 ; Hine & Wesney, 1994a, b), de *Perkinsus marinus* et d'*Haplosporidium nelsoni* chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica* (Ford *et al.*, 1993 ; Lapeyre *et al.*, 1995a). Dans le cas des parasites *B. ostreae* et *Bonamia sp.*, des vésicules parasitophores et non pas des phagolysosomes ont été détectés dans les grands hyalinocytes, (Chagot, 1989 ; Chagot *et al.*, 1992 ; Hine & Wesney, 1994a, b). Ceci laisse suspecter que les enzymes lysosomiales ne participent pas à la dégradation de ces parasites du fait d'une absence de fusion des vésicules parasitophores avec les lysosomes.

II.4.1.3.6 Types hémocytaires impliqués dans la phagocytose

Des études sur la phagocytose ont permis de montrer que les types hémocytaires (hyalinocytes et granulocytes) présents dans l'hémolymphe n'avaient pas les mêmes capacités de phagocytose. Les granulocytes seraient les cellules les plus actives dans le processus de phagocytose du fait de la présence des granules (lysosomes) contenant des enzymes hydrolytiques (Cheng, 1981, 1983, 1990 ; Moore et Gelder, 1983 ; Auffret, 1985 ; Pipe, 1990). L'implication de ce type cellulaire dans la phagocytose est également liée à une mobilité cellulaire plus rapide (McCormick-Ray & Howaerd 1991). Cela a été montré chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*. Chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, seuls les granulocytes sont capables de phagocyter les particules de zymosan et les bactéries *Vibrio tapetis*, alors que les hyalinocytes ne semblent pas impliquer dans la phagocytose de ces corps étrangers (Carballal *et al.*, 1997b). Hine & Wesney (1994) ont rapporté que le parasite *Bonamia sp.* était phagocyté par tous les types hémocytaires. Un résultat similaire a été rapporté chez l'huître plate *Ostrea edulis* infectée par le parasite *Bonamia ostreae* où le parasite a été détecté dans les granulocytes et les hyalinocytes (Cochennec *et al.*, 2003).

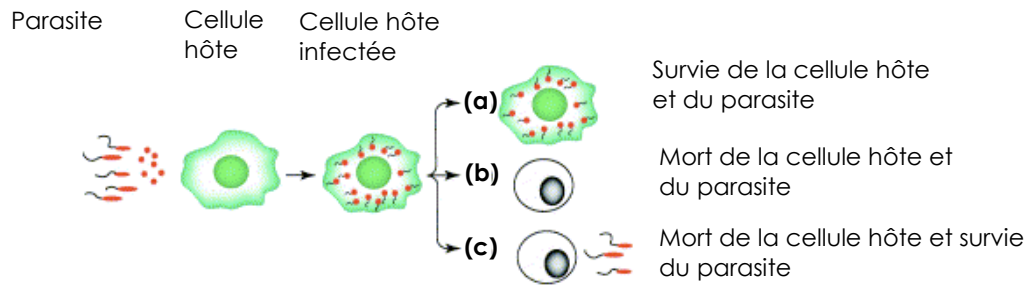


Figure 19 : Représentation des effets directs du parasite dans la mort de la cellule hôte. **(a)** Le parasite infecte une cellule hôte et bloque l'apoptose afin de rester dans la cellule hôte et s'y multiplie. **(b)** Activation de l'apoptose de la cellule hôte, ce qui peut causer la mort du parasite. **(c)** Propagation des parasites (modifiée d'après Lüder *et al.*, 2001).

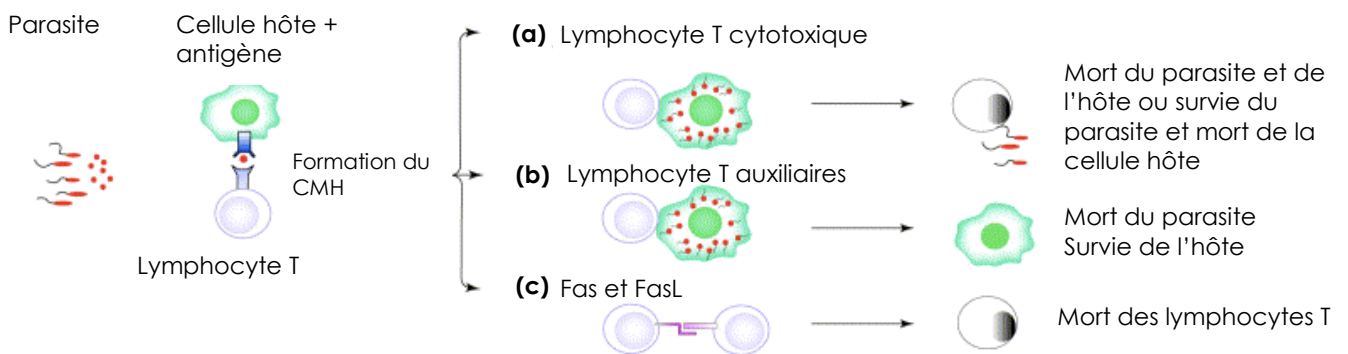


Figure 20 : Représentation des mécanismes indirects de la mort cellulaire au cours d'une infection par des parasites intracellulaire. **(a)** les cellules cytotoxiques T tuent les cellules cibles infectées et, éventuellement, le parasite dans les cellules hôtes. **(b)** les lymphocytes T auxiliaires activent les macrophages infectés pour tuer les parasites intracellulaires. **(c)** Les cellules T activées expriment Fas et Fas ligand (FasL) et deviennent vulnérables à la mort par apoptose induite par la signalisation Fas (modifiée d'après Lüder *et al.*, 2001).

II.4.1.4 Mort cellulaire programmée (MCP) ou apoptose

L'apoptose, mort cellulaire programmée (MCP) ou suicide cellulaire, peut être déclenchée par de nombreux facteurs externes. Elle se caractérise par la condensation et la fragmentation de l'ADN, un arrondissement des cellules et des transformations caractéristiques au niveau des membranes cellulaires par le bourgeonnement des membranes (Kim & Sharma, 2004). L'apoptose est un phénomène actif différent des phénomènes de nécrose. L'apoptose est un mécanisme intervenant dans la réponse immunitaire, car elle peut empêcher ou limiter la dissémination des agents infectieux dans l'organisme. Il a été caractérisé des cellules apoptotiques chez l'hôte suite à une infection par des parasites intracellulaires (**Figure 19 et 20**) (Lüder *et al.*, 2001). Les parasites intracellulaires peuvent manipuler ce phénomène en l'inhibant ou l'induisant (**Tableau 2**).

L'apoptose peut être activée par deux voies, une voie extrinsèque et une voie intrinsèque. La voie extrinsèque est déclenchée par l'intermédiaire de récepteurs de la super-famille des TNF α (Fas-ligand et TNFR). Ces récepteurs permettent d'activer la cascade d'activation de l'apoptose (**Figure 21**) conduisant à la mort cellulaire. La voie intrinsèque est principalement assurée par la mitochondrie. Cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2. Les protéines de cette superfamille des protéines homologues à Bcl-2 jouent un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose, car certaines sont pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid et Bim) et d'autres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Nr13). Cette régulation passe par la modulation de l'activité de certaines caspases, principalement la caspase 9. Ainsi, en empêchant la libération du cytochrome c par la mitochondrie, Bcl-2 et Bcl-xL inhibent la formation du complexe APAF1/cytochrome c/procaspase 9 nécessaire à l'apoptose.

Ces mécanismes ont largement été étudiés chez les vertébrés. Chez les bivalves, plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence ce mécanisme cellulaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, chez l'huître américaine *C. virginica*, chez l'huître plate *Ostrea edulis*, chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Renault *et al.*, 2000 ; Lacoste *et al.*, 2001 ; Sunila & LaBanca, 2003 ; Da Silva *et al.*, 2006).

| Espèces | Type de modulation | Type de cellule | Mécanisme | Références |
|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--|
| <i>Cryptosporidium parvum</i> | Induction | Cellules intestinales et épithéliales | Fas et Fas-L | Chen <i>et al.</i> , 1998, Chen <i>et al.</i> , 1999, Ojcius <i>et al.</i> , 1999, McCole <i>et al.</i> , 2000 |
| | Inhibition | Cellules intestinales et épithéliales | Activation de la voie NF- κ B | McCole <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Leishmania dovonii</i> | Induction | CD4+ | ND | Das <i>et al.</i> , 2000 |
| | Inhibition | Macrophages | Activation du TNF- α | Moore & Matlashewski 1994 |
| <i>Leishmania braziliensis</i> | Induction | CD4+ et CD8+ | ND | Bertho <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Plasmodium sp.</i> | Induction | Lymphocytes | Fas et Fas-L | Toure-Balde <i>et al.</i> , 1995, Toure-Balde <i>et al.</i> , 1996, Helmby <i>et al.</i> , 2000, Hirunpetcharat & Good 1998, Kern <i>et al.</i> , 2000, Toure-Balde <i>et al.</i> , 2000, Matsumoto <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Theileria parva</i> | Inhibition | Lymphocytes T | Activation de la voie NF- κ B | Heussler <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Induction | Lymphocytes T et macrophages | Sur expression FAS | Khan <i>et al.</i> , 1996, Liesenfeld <i>et al.</i> , 1997, Hu <i>et al.</i> , 1999, Hisaeda <i>et al.</i> , 1997 |
| | Inhibition | Macrophages | Expression de l'HSP65 | Hisaeda <i>et al.</i> , 1997, Nash <i>et al.</i> , 1998, Goebel <i>et al.</i> , 1999, Orlofsky <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Trypanosoma cruzii</i> | Induction | Lymphocytes T et macrophages | Fas et Fas-L, NO, IFN γ | Lopes <i>et al.</i> , 1995, Nunes <i>et al.</i> , 1998, Martins <i>et al.</i> , 1998, Leguizamon <i>et al.</i> , 1999, Lopes <i>et al.</i> , 1999, Freire-de-Lima <i>et al.</i> , 1998 |
| | Inhibition | Macrophages | Expression de l'HSP65 | Chuenkova & Pereira, 2000, Sakai <i>et al.</i> , 1999 |

Tableau 2 : Induction ou inhibition de l'apoptose chez les cellules hôtes par des parasites intracellulaires

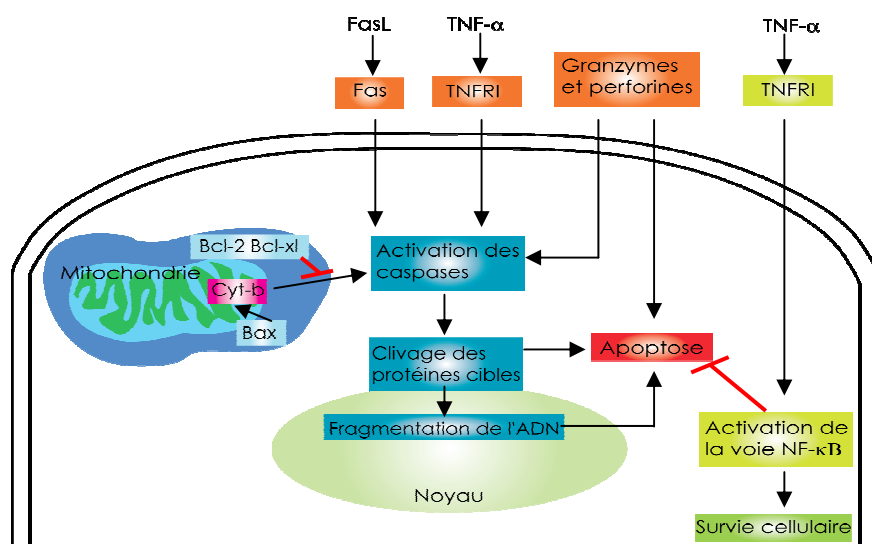


Figure 21 : Modèle simplifié des voies de signalisation pouvant induire ou inhiber l'apoptose (modifiée d'après Lüder *et al.*, 2001)

Les phénomènes d'apoptose étudiés précédemment ont été caractérisés en réponse à des stimuli tels que l'environnement (Da Silva *et al.*, 2006), certains agents infectieux (Renault *et al.*, 2000 ; Sunila & LaBanca, 2003). Plus récemment, chez l'ormeau *Haliotis discus discus*, il a été caractérisé un gène codant pour une protéine présentant une forte homologie avec la molécule Fas-ligand qui est impliquée comme récepteur dans l'activation de la cascade de la voie apoptotique (De Zoysa *et al.*, 2009). Un autre récepteur impliqué dans la cascade de signalisation de la voie apoptotique a été caractérisé chez le pétoncle *Chlamys farreri*, le TNFR (CfTNFR) (Li *et al.*, 2009). De plus, l'étude des transcrits de ces deux gènes a permis d'observer une sur-expression en présence de bactéries.

II.4.2 Substances solubles présentes dans l'hémolymphe

II.4.2.1 Enzymes hydrolytiques lysosomales

Les enzymes lysosomales sont présentes dans la partie acellulaire de l'hémolymphe et à l'intérieur des cellules. Les enzymes hydrolytiques sont notamment impliquées dans la dégradation des organismes infectieux, les enzymes hydrolytiques lysosomales jouent un rôle important chez les bivalves marins du fait de leurs multiples activités (Xue & Renault, 2000). La présence extracellulaire des enzymes hydrolytiques lysosomales résulterait d'une dégranulation des granulocytes durant la phagocytose (Cheng, 1981). Les activités lysosomales ont largement été étudiées chez les mollusques bivalves marins (Moore & Gelder, 1985 ; Beckmann *et al.*, 1992 ; Toreilles *et al.*, 1997, Xue & Renault, 2000 ; Da Silva *et al.*, 2008). Les enzymes hydrolytiques lysosomales sont composées principalement de la β -glucuronidase, la phosphatase acide (ACP) et la phosphatase alcaline (ALP), les aminopeptidases, les estérases, l'amylase, la lipase, la β -galactosidase et le lysozyme. Ces activités ont été détectées chez l'huître plate *Ostrea edulis* (Xue, 1999). Le gène codant pour la lysosozyme a été caractérisé chez *Ostrea edulis* AB179776 (Matsumoto *et al.*, 2006).

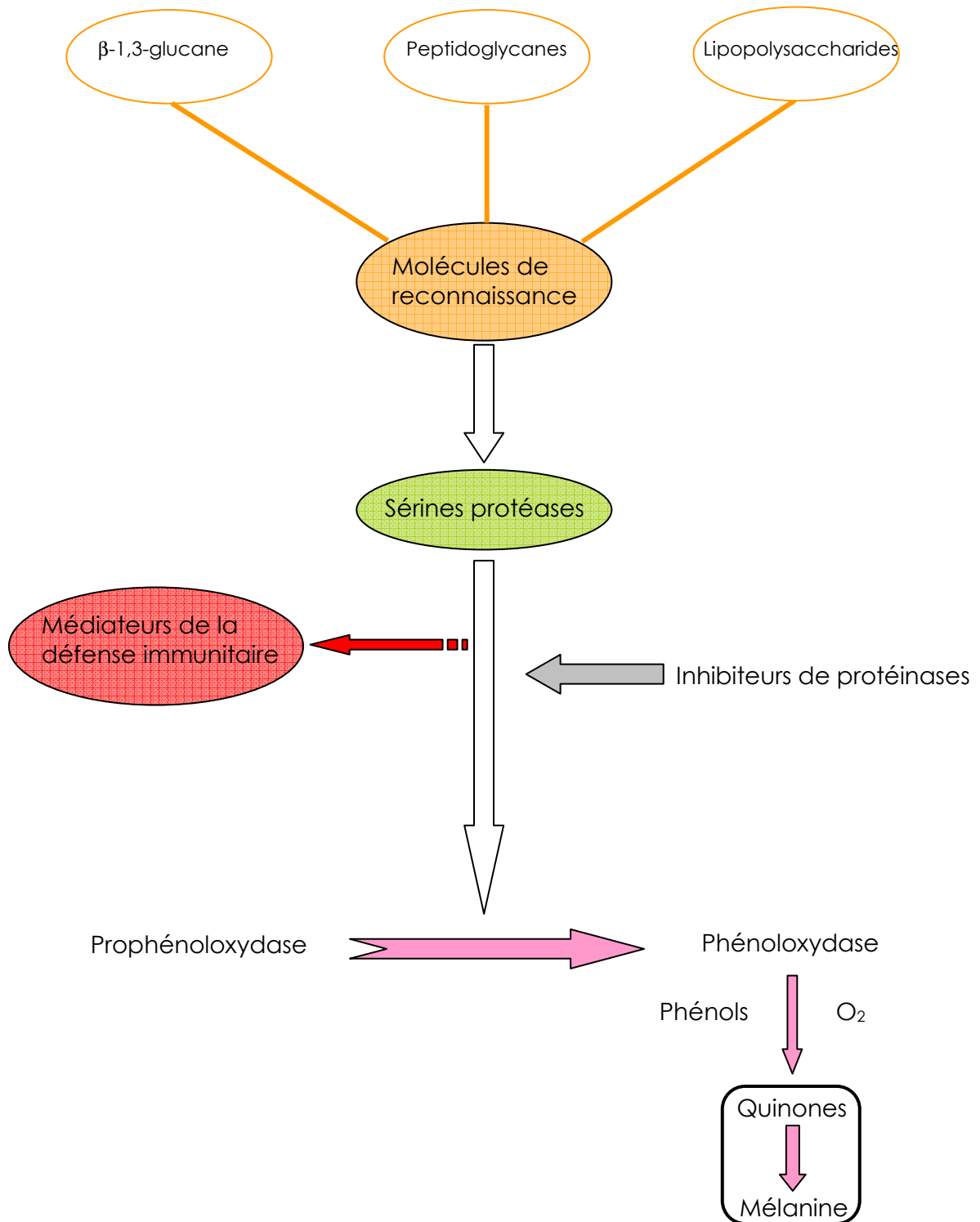


Figure 22 : Activation de la cascade phénoloxydase chez les invertébrés (d'après Söderhäll & Cerenius, 1998)

II.4.2.2 Protéines de stress

Les protéines de stress sont produites par tous les organismes vivants en réponse à un stress biotique ou abiotique (polluant, température, salinité). Ces protéines sont très conservées, leur masse moléculaire varie entre 29 et 100 kDa. Ces protéines sont communément appelées Heat Shock Proteine (HSP). Les HSPs sont des protéines chaperonnes impliquées dans l'élimination des molécules dégradées. Initialement décrites en réponse à une augmentation de température, ces protéines sont impliquées dans d'autres situations de stress. Leur rôle est la protection, le maintien et la régulation des fonctions des protéines. Chez les mollusques bivalves, ces protéines ont été décrites suite à des stress tels que des variations de température (Buckley *et al.*, 2001), de salinité (Tirard *et al.*, 1997) et à l'exposition à des polluants (Moraga *et al.*, 2005). Ces molécules peuvent aussi participer aux mécanismes de défense (Tirard *et al.*, 1997, Lacoste *et al.*, 2001 ; Perrigault *et al.*, 2009). Chez *Ostrea edulis*, plusieurs études ont permis d'identifier plusieurs isoformes d'HSP 70 suite à des stress thermiques et par l'ajout de contaminants (Piano *et al.*, 2002 ; Boutet *et al.*, 2003 ; Corporeau & Auffret, 2003 ; Piano *et al.*, 2004 ; Piano *et al.*, 2005).

II.4.2.3 Système pro-phénoloxydase/ phénoloxydase

La phénoloxydase (PO) est une enzyme impliquée dans la production de mélanine, la mélanine est le composé terminal du système pro-phénoloxydase. La PO oxide les monos et di-phénols ; elle catalyse la réaction de conversion de la L-dihydrophénylalanine (L-dopa) en quinone qui forme, par polymérisation la mélanine. Au cours de la formation de la mélanine, des composés intermédiaires bactéricides tels que l'o-quinone sont formés (Coles & Pipe, 1994 ; Söderhäll & Cerrenius, 1998). Le système pro-phénoloxydase peut être stimulé par l'ajout de β -glucan et des lipopolysaccharides. Cette stimulation active la cascade des sérines protéases qui permet le clivage de la prophénoloxydase en phénoloxydase (**Figure 22**).

Le système pro-phénoloxydase intervient chez les invertébrés dans la défense contre les agents infectieux. Il n'est pas rapporté chez les vertébrés. Plus précisément, la phénoloxydase catalyse la réaction d'oxydation intervenant dans le processus de

réparation des blessures, d'encapsulation et de mélanisation (Söderhäll & Cerenius, 1983).

L'existence du système pro-phénoloxydase a été mis en évidence dans l'hémolymphe de certains mollusques bivalves tels que ; *Placopecten magellanicus*, *Argopecten irradians*, *Guekensia demissa*, *Mya arenaria* (Deaton et al., 1999), *Mytilus edulis* (Coles & Pipes, 1994), *M. galloprovincialis* (Carballal et al., 1997a), *Perna viridis* (Asokan et al., 1997), *Saccostrea glomerata* (Newton et al., 2004), *Anodonta cygnea* (Soares-da-Silva et al., 2002), *Crassostrea gigas* (Luna-Gonzalez et al., 2003 ; Gagnaire et al., 2004 ; Raftos et al., 2004, Hellio et al., 2007) et *Ostrea edulis* (Da Silva et al., 2008). Da Silva et al., (2008) rapportent que la quantité de phénoloxydase détectée dans l'hémolymphe est plus faible chez des individus infectés par le parasite *Bonamia ostreae*. Le parasite *B. ostreae* serait donc capable d'inhiber le système phénoloxydase. Cependant, l'implication de la phénoloxydase dans les systèmes de défense des mollusques bivalves reste à approfondir.

II.4.2.4 L'Oxyde Nitrique Synthétase

L'Oxyde Nitrique Synthétase (NOS) peut catalyser la production d'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine en utilisant le NADPH comme cofacteur. Le composé N-OH-Arginine résultant peut réagir avec d'autres EOR et forme un oxydant fort, le peroxy-nitrite (ONOO⁻) qui est un composé microbicide (Ottaviani et al., 1993). Ce processus a été identifié chez les mollusques bivalves (Conte & Ottaviani, 1995).

II.4.2.5 Inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases participent aux mécanismes de défense chez les vertébrés et les invertébrés. Un des rôles de ces inhibiteurs est d'éviter l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes (composées en partie de sérines protéases) qui génèrent des composés toxiques (quinones, complexe d'attaque membranaire) pouvant conduire à des dommages tissulaires pour l'hôte. D'autre part, ces inhibiteurs agissent contre les protéases de bactéries et protozoaires pathogènes. Ces protéases constituent de véritables facteurs de virulence permettant aux agents infectieux de s'introduire dans l'hôte et d'y proliférer (Lepore

et al., 1996). Chez les huîtres *Crassostrea virginica* et *C. gigas*, il a été détecté des activités inhibitrices contre de nombreuses protéases exogènes produites par des agents infectieux tels que *Vibrio vulnificus* et *Perkinsus marinus* (Faisal et al., 1998). L' α 2-macroglobuline, les inhibiteurs de sérines protéases (les serpines) et les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP) sont les principaux inhibiteurs de protéases permettant de bloquer l'action d'une protéase produite par un agent infectieux.

II.4.2.5.1 α 2-macroglobuline

L' α 2-macroglobuline permet d'inhiber les protéases par son mode d'action de «piégeage» des protéases (Hibbetts et al., 1999). Sous l'action d'une protéase, la conformation de l' α 2-macroglobuline change, exposant un domaine servant de ligand aux récepteurs des phagocytes. L' α 2-macroglobuline a été caractérisée chez certains mollusques et présente de forte ressemblance avec des molécules des invertébrés (Kawabata & Tsuda, 2002). Cet inhibiteur de protéases a également été identifié chez *Biomphalaria glabrata* (Bender & Bayne, 1996), *Helix pomatia* (Yigzaw et al., 2001), *Chlamys farreri* (Ma et al., 2005) et chez *Crassostrea gigas* (Renault com. pers.).

II.4.2.5.2 Serpines

Les serpines ou inhibiteurs de sérines protéases constituent une large famille connue chez les vertébrés. Elles participent notamment à la régulation des sérines protéases au cours de l'inflammation, de la coagulation, et de l'activation du complément. La présence de serpines a été décrite chez plusieurs invertébrés (*C. elegans*, *Tachypleus tridentatus*, et *Drosophila* sp.) par identification biochimique et par biologie moléculaire (Silverman et al., 2001). Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, une EST a été identifiée comme homologue à une serpine mais sa fonction n'a pas été définie (Gueguen et al., 2003). Plus récemment, il a été identifié une protéine de type serine protease inhibitor (cvS-1) chez *C. virginica*. Cette protéine est retrouvée dans la glande digestive. La purification de cette protéine a permis de montrer *in vitro* une inhibition de la prolifération du parasite *Perkinsus marinus* (Lapeyre et al., 2010).

II.4.2.5.3 Inhibiteurs de métalloprotéases

Chez les vertébrés, les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP) interviennent au cours des réactions inflammatoires et permettent de réguler l'activité de métalloprotéases de la matrice extracellulaire ou lors d'interaction avec des protéines inflammatoires (Brew *et al.*, 2000).

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* a été mis en évidence une forte augmentation des transcrits de Cg-Timp suite à des stimuli bactérien de type vibrions pathogènes (Montagnani *et al.*, 2007 ; Tirape *et al.*, 2007).

II.4.2.6 Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des effecteurs du système immunitaire répandus dans le règne vivant. Les peptides antimicrobiens permettent de protéger les cellules contre les agents infectieux. De nombreux peptides antimicrobiens ont été décrits chez les vertébrés et les invertébrés. L'étude de leur structure et de leur composition en acides aminés a permis d'établir plusieurs groupes (Yeaman & Yount, 2003). Ils sont généralement répartis en trois groupes : (1) les peptides linéaires formant des hélices α et dépourvus de cystéines, (2) les peptides cycliques riches en cystéines, (3) les peptides riches en résidus proline, glycine, arginine ou histidine (Bulet *et al.*, 2004). Les peptides antimicrobiens sont généralement compris entre 12 et 50 acides aminés.

Chez les mollusques bivalves, plusieurs peptides antimicrobiens ont été caractérisés notamment chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis* (Charlet *et al.*, 1996 ; Mitta *et al.*, 1999a, 1999b, 2000). Ces travaux ont permis de mettre en évidence quatre groupes de peptides cationiques riches en cystéine et présentant des ponts disulfures : les myticines, les mytilines, les mytimicines et les défensines.

Les défensines et myticines ont un spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif. Les myticines sont antibactériennes et antifongiques alors que la mytimicine est uniquement antifongique. Une big-défensine a été identifiée chez *Mercenaria mercenaria*. L'analyse de l'expression de cette défensine a permis d'observer une

sur expression de ce gène dans le manteau en réponse à une infection par QPX (Quahog Parasite X) (Perrigault *et al.*, 2009). Chez *Crassostrea gigas*, il a été identifié un peptide antimicrobien de type défensine Cg-def. Il est fortement exprimé dans le manteau et présente une activité contre les bactéries à Gram positif (Gueguen *et al.*, 2006). Une approche moléculaire a permis de caractériser deux isoformes de défensines (Cg-def1 et Cg-def2) chez *C. gigas* (Gonzalez *et al.*, 2007). Un nouveau peptide antimicrobien riche en proline a été décrit chez l'huître creuse *C. gigas*. Ce peptide est composé de 61aa (Gueguen *et al.*, 2009). Chez l'huître américaine, *C. virginica*, il a été identifié un peptide antimicrobien de type défensine (American Oyster Defensin, AOD). Le peptide AOD est exprimé dans les hémocytes et possède un spectre d'activité plus large que les défensines identifiés chez l'huître creuse (Seo *et al.*, 2005).

Aucun peptide antimicrobien n'a été caractérisé chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Cependant, des travaux ont été réalisés afin d'étudier l'effet d'un peptide antimicrobien isolé chez la limule la tachypleisine I, sur le parasite *Bonamia ostreae* purifié (Morvan *et al.*, 1997). Les résultats ont permis d'observer un effet sur le parasite à 500 µg/ml de tachypleisine. Une étude similaire a été réalisée avec un autre peptide antimicrobien la magainine 1, la magainine isolée chez l'amphibien *Xenopus laevis*. La concentration de 500 µg/ml permet de réduire de 94% la viabilité du parasite purifié (Morvan *et al.*, 1994).

II.4.2.7 Cytokines

Les cytokines sont des substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules et/ou tissus. Les substances solubles permettent d'assurer des communications cellulaires entre les cellules. Les cytokines sont fortement impliquées dans le système de défense, mais leurs fonctions sont variées et complexes. Les cytokines interviennent dans de nombreux processus biologiques comme l'embryogenèse, l'hématopoïèse, la réponse immunitaire ou l'inflammation. La famille des cytokines est composée des interleukines (IL), interférons (IFN) et des chémokines (TNF Tumor Necrosis Factor, CSF Colony Stimulating Factor, TGF Transforming Growth Factors).

Les interleukines constituent plusieurs sous familles impliquées dans un grand nombre de fonctions. Il a été détecté des activités de type IL-1 (anti-tumoral, modulateur de l'apoptose) et IL-6 (facteur hématopoïétique) chez la moule *Mytilus edulis* (Hughes *et al.*, 1991). Chez *Crassostrea gigas*, le gène de l'interleukine 17 (cgIL-17) a été caractérisé. Une sur expression des transcrits de ce gène a été observée suite à l'injection d'un mélange de bactéries (*Micrococcus luteus*, *Vibrio splendidus* et *Vibrio anguillarum*) (Robert *et al.*, 2008).

Trois types d'interféron sont décrits chez les vertébrés IFN α , IFN β et IFN γ . Les IFN α sont produits par les cellules de la lignée hématopoïétique (leucocytes principalement). Les IFN β sont produits par de nombreux types cellulaires et en particulier les fibroblastes et les cellules épithéliales. Les IFN γ sont produits par les cellules T activées et les cellules NK (Natural killer). Aucun IFN n'a été caractérisé à ce jour chez les invertébrés.

Parmi les chémokines, deux types de TNF sont rapportés, le TNF α et β . Le TNF est impliqué dans la réponse antivirale comme les IFNs, mais peut induire un message de mort cellulaire programmée ou apoptose. Les TNFR interviennent comme récepteur pour activer les cascades d'activation cellulaire comme la voie NF-KB et MAPK. Le premier TNF α chez un mollusque a été caractérisé chez l'ormeau *Haliotis discus discus* (AbTNF- α) (De Zoysa *et al.*, 2009). L'étude des transcrits de ce gène a permis d'observer une sur expression de ce gène en présence de bactéries (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Lysteria monocytogenes*), de virus (VHSV) et du LPS (De Zoysa *et al.*, 2009).

Le TGF α est produit par les macrophages, les neurones et les kératinocytes, et est principalement impliqué dans la prolifération cellulaire. Le TGF α est surexprimé dans les cellules cancéreuses. La famille des TGF β est présente sous trois formes TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3. Le TGF β est impliqué dans la régénération des tissus, la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire, et la régulation du système immunitaire (Javelaud & Mauviel, 2004). Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, il a été caractérisé plusieurs types de récepteur ligand de la super-famille des TGF β (Lelong *et al.*, 2000 ; Herpin *et al.*, 2004 ; Lelong *et al.*, 2007 ; Huvet *et al.*, 2004 ; Fleury *et al.*, 2008).

II.4.3 Facteurs affectant les mécanismes de défense chez les mollusques

II.4.3.1 Origine génétique

L'origine génétique chez les mollusques bivalves peut être impliquée dans la résistance vis-à-vis d'une maladie infectieuse. Ceci indique qu'une maladie pourrait donc être contrôlée grâce à l'amélioration génétique par identification de marqueurs génétiques ou traits physiologiques impliqués directement dans la résistance à un agent infectieux. Plusieurs travaux ont été menés sur les bivalves marins afin d'identifier quels sont les facteurs impliqués dans la résistance à une maladie infectieuse. Les études révèlent une forte variabilité individuelle au sein d'une même espèce. Gaffney & Bushek (1996) indiquent que l'installation d'une maladie et son développement peuvent être influencés par les variations physiologiques liées à l'environnement ou à l'origine génétique. Des travaux ont été menés sur l'identification de régions d'un génome d'une huître liée à un caractère de survie suite à des mortalités associées à la présence d'un agent infectieux (Lallias, 2008 ; Sauvage *et al.*, 2010). Les exemples de travaux de sélection réalisés sur les quelques espèces conchylicoles sont présentés dans la partie 1 §II.3.2.

II.4.3.2 Environnement

La culture des mollusques bivalves est principalement réalisée en milieu ouvert sur l'estran ou en pleine mer. Les animaux placés dans cet environnement sont soumis aux conditions du milieu. Le milieu marin est complexe et instable, il peut être modifié et soumis à de fortes variations soit liées au climat (modification des facteurs naturels), à l'anthropisation (contaminants). De plus, l'ostréiculture est souvent réalisée dans des milieux de type estuarien, ces milieux sont fortement soumis aux rejets des bassins versants. Les variations peuvent déclencher une altération du système immunitaire et donc rendre plus vulnérable les animaux vis-à-vis des agents infectieux ou même entraîner la mort des animaux dans des conditions extrêmes (Gagnaire *et al.*, 2007).

II.4.3.2.1 Facteurs naturels

Les facteurs naturels pouvant affecter les mécanismes de défense des mollusques sont principalement la température, la salinité et le cycle tidal. Les mollusques bivalves sont eurythermes et euryhalins. Malgré ces propriétés, les bivalves peuvent mal supporter une forte variation de température ou de salinité.

Les huîtres placées sur estran sont soumises à de fortes variations de température en période estivale (Soletchnik *et al.*, 1998). Une forte élévation de température peut entraîner des effets négatifs sur les mécanismes de défense des huîtres. L'augmentation de la température peut induire une augmentation du nombre d'hémocytes circulant chez *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1998), du pourcentage de granulocytes chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica* (Chu et La Peyre, 1993). Une modification de la température peut entraîner des effets au niveau des activités cellulaires des hémocytes notamment au niveau de la phagocytose, une diminution de la phagocytose est observée au cours d'une élévation de température chez *C. virginica* (Hégaret *et al.*, 2003 ; Alvarez *et al.*, 1989) de même chez l'huître creuse *C. gigas* (Gagnaire *et al.*, 2006). Ce résultat a été observé chez *Ostrea edulis* (Fisher *et al.*, 1987). Une augmentation de la température peut entraîner une déstabilisation des membranes lysosomales chez *Perna viridis* (Hauton *et al.*, 1998, 2001).

L'expression de l'HSP 70 des hémocytes chez *Ostrea edulis* est augmentée suite à une élévation de température (Corporeau & Auffret, 2003). Il semblerait donc qu'une élévation de température chez *O. edulis* ne lui soit pas bénéfique. Cependant, à l'inverse une augmentation de température (de 14°C à 21°C) semble être bénéfique sur les paramètres hémocytaires chez la palourde *Ruditapes phillipinarum* qui présente alors une augmentation de la quantité d'hémocytes circulants et viables et de l'activité leucine-amino peptidase. De plus, ces auteurs ont montré qu'à 21°C la prévalence de l'anneau brun était diminuée (Paillard *et al.*, 2004).

Pendant les périodes hivernales, il est possible d'observer de faibles températures, ces faibles températures peuvent présenter des effets néfastes sur les mécanismes de défenses. Une diminution de la température peut entraîner une diminution du

processus d'agrégation chez *Mytilus californianus* (Chen & Bayne, 1995) et de la phagocytose des hémocytes de *Crassostrea virginica* (Alvarez et al., 1989). Chez *C. gigas*, l'exposition des hémocytes *in vitro* à de faibles températures n'affecte pas la phagocytose ni la production d'estérase et la mortalité cellulaire (Gagnaire et al., 2006a).

La salinité est le deuxième facteur naturel pouvant influencer sur les mécanismes de défense des mollusques bivalves. Une faible salinité déstabilise la membrane des hémocytes (Hauton et al., 1998) et induit une diminution de la phagocytose chez *Ostrea edulis* (Fisher et al., 1987). Chez *Crassostrea gigas*, une hyposalinité induit une forte mortalité hémocytaire alors qu'une hypersalinité induit une mortalité cellulaire (Gagnaire et al., 2006a). L'hyposalinité induit une diminution de la production des estérases chez *C. gigas* (Gagnaire et al., 2006a).

Le cycle tidal peut avoir un effet sur les paramètres hémocytaires. Les huîtres à marée basse étant émergées, l'animal est contraint de faire fonctionner ces mécanismes anaérobies, des risques d'hypoxie peuvent donc alors apparaître. Les hémocytes de *Mercenaria mercenaria* produisent moins d' H_2O_2 à marée basse (Hawkins et al., 1993).

II.4.3.2.2 Contaminants

Plusieurs contaminants sont retrouvés dans le milieu marin tels que des pesticides, HAPs, PCB, métaux lourds (cadmium, mercure, cuivre) ou organoétains (TBT). Ces contaminants peuvent modifier la qualité de l'hémolymphe, ses propriétés et les activités des hémocytes.

Une étude réalisée sur les activités des hémocytes de *Crassostrea gigas* a permis de montrer l'effet de pesticides seuls ou en mixture (Gagnaire et al., 2005). L'atrazine seule n'induit pas d'effet sur les activités des hémocytes (Gagnaire et al., 2003). En revanche, l'exposition d'un mélange de pesticides induit une diminution de l'agrégation hémocytaire spontanée (Auffret & Oubella, 1997). Le paraoxon diminue significativement la production des estérases et des EOR (Gagnaire et al., 2006b). Le chlorohalonil (antifongique) augmente la mortalité cellulaire et le pourcentage de

granulocytes. Ce même pesticide induit une diminution de la production des estérases (Gagnaire *et al.*, 2006b).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, communément appelés HAP, sont une famille de composés chimiques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure des molécules comprend au moins deux cycles aromatiques condensés. Les principaux HAPs étudiés chez les mollusques bivalves sont le benzo(a)pyrène (BaP), phénanthrène, l'antracène et le fluoranthène. Une étude sur ces HAPs a permis de mesurer leurs effets sur l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*. Les résultats ont permis globalement d'observer une augmentation de la mortalité, une diminution de la production des estérases et des lysosomes (Gagnaire *et al.*, 2005). D'autres corrélations ont été trouvées entre HAP et lysozyme, chez *C. virginica* (Fisher *et al.*, 2003), SOD, cytochrome p450 et catalase chez *Mytilus galloprovincialis* (Porte *et al.*, 1991) et NADPH-P450 réductase chez *M. galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, *C. gigas* et *Ruditapes decussatus* (Sole *et al.*, 1994).

Les PCB induisent diverses modifications notamment le PCB 77 diminue la stabilité des membranes des lysosomes (Canesi *et al.*, 2003). Chez *Crassostrea gigas*, l'exposition de ce PCB sur l'hémolymphe a permis d'observer une diminution des lysosomes (Gagnaire *et al.*, 2006b).

Les métaux lourds sont présents dans le milieu marin et certains d'entre eux peuvent induire des modifications au niveau des activités hématocytaires. Le cadmium provoque une augmentation de l'expression des métallothionéines (MT) chez *Ostrea edulis* (Corporeau & Auffret, 2003). Le mercure augmente *in vitro* la mortalité cellulaire chez *Crassostrea gigas* (Gagnaire *et al.*, 2004).

II.4.3.3 Agents infectieux

Différents agents infectieux (virus, bactéries et protozoaires) ont été décrits chez les mollusques bivalves. Certains de ces agents infectieux sont capables de résister aux mécanismes de défense mis en place par leur hôte. Ils sont capables de moduler les activités des hématocytes, voire même de produire des substances solubles afin d'éviter leur dégradation et donc s'installer dans l'organisme hôte. Après avoir

échappé à la dégradation, les agents infectieux peuvent s'y multiplier, puis causer la mort de l'animal.

Dans ce paragraphe, les agents infectieux considérés sont les virus et les bactéries. Les relations hôtes/parasites sont traitées dans le paragraphe IV de cette même partie.

Chez la palourde *Ruditapes phillipinarum*, une augmentation du taux d'hémocytes circulants a été observée après injection de *Vibrio tapetis*. Différents auteurs interprètent ce résultat comme une mobilisation des hémocytes vers le site d'infection afin de limiter la dissémination de l'agent infectieux dans l'animal. Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, il a été montré une augmentation des hémocytes circulants et une inhibition de leur capacité d'adhésion et de phagocytose après infection par *V. aestarianus* (Labreuche *et al.*, 2006). Lors de cette même étude, il a été mis en évidence une dérégulation du système oxydatif par une augmentation de la production d'EOR concomitante à une diminution du niveau des transcrits du gène de la super oxyde dismutase (Labreuche *et al.*, 2006).

Les interactions entre mollusques bivalves et virus ont été étudiées au travers d'approches moléculaires afin d'identifier les gènes viro-induits chez l'huître creuse en présence du virus OsHV-1 (Renault *et al.*, 2007). Ces approches ont permis d'identifier des gènes comme IFI 44, le MyD88, le Molluscan defence molecule precursor et une laccase ou multicooper oxydase. L'expression de ces gènes a été étudiée suite à des infections expérimentales réalisées. Une forte surexpression de l'IFI 44 et du MyD88 est observée après 48h d'infection (Tourancheau, 2009).

II.4.4 Mémoire et spécificité immunitaire chez les invertébrés ?

Chez les invertébrés, la réponse immunitaire repose sur une réponse dite innée. En effet, les invertébrés sont dépourvus de lymphocytes et d'immunoglobulines (Ig) participant à l'immunité adaptative chez les vertébrés. Cependant, des travaux récents évoquent l'existence d'une réponse spécifique au travers de la présence de récepteurs spécifiques comme les PRPs (Pathogen Recognition Pattern) (Schmid-

Hempel, 2005 ; Rowley & Powel, 2007 ; Schulenburg *et al.*, 2007) (**Figure 23**) et par l'identification du phénomène de « priming » (sensibilisation).

II.4.4.1 Pathogen Recognition Pattern (PRPs)

Les PRPs sont des récepteurs activés lors de la reconnaissance de PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Dès la reconnaissance de PAMPs, les récepteurs sont capables d'induire une destruction des agents infectieux par des mécanismes tels que l'encapsulation et la phagocytose, ou indirectement par l'induction des voies de signalisation intracellulaires qui contrôlent la transcription des gènes effecteurs (Hultmark, 2003 ; Dimopoulos, 2003 ; Brennan & Anderson, 2004).

Il a été identifié des PRPs chez les invertébrés comme le « fester » chez l'ascidie *Botryllus schosseri* (Nyholm *et al.*, 2006), chez la drosophile *Drosophila melanogaster* et le moustique *Anophele gambiae* (Watson *et al.*, 2005 ; Dong *et al.*, 2006). Le fester est le premier PRP identifié chez les invertébrés permettant de reconnaître le non soi. Chez le moustique, *A. gambiae*, il a été montré que des bactéries de type Gram négatif induisent différentes formes d'épissage des DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule), une protéine de la super famille des immunoglobulines. Dong *et al.* (2006) ont montré que les variants d'épissage de DSCAM sont liés à la nature de l'organisme infectieux.

Chez *Biomphalaria glabrata*, il a été identifié une molécule de type FREP (Fibrinogen-Related Proteins). Les FREPs (fibrinogen-related proteins) sont constituées d'un domaine de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) en position amino-terminale, et d'un domaine de type fibrinogène (FBG) en position carboxy-terminale (Adema *et al.*, 1997). Il a été identifié une grande variabilité génétique au niveau de ces gènes : 314 séquences ont été obtenues à partir de 22 individus. Cette grande variabilité génétique pourrait expliquer l'existence d'une reconnaissance du non soi. Cependant, le rôle exact de ces molécules lors d'une infection n'est pas élucidé. Il semble que les FREPs soient capables de reconnaître une large gamme de molécules provenant de divers agents infectieux aussi bien procaryotes et eucaryotes (Zang *et al.*, 2008).

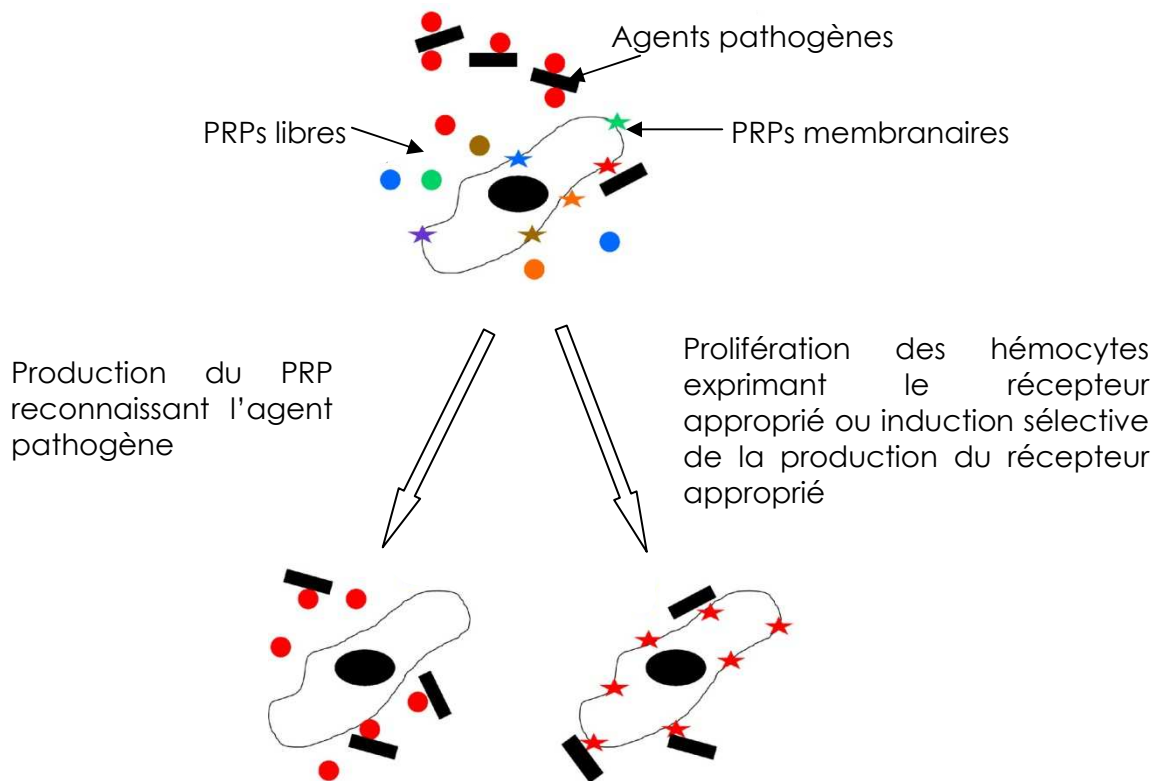


Figure 23 : Mécanisme de la réponse immunitaire spécifique par l'intermédiaire des PRPs (modifié d'après Rowley *et al.*, 2007)

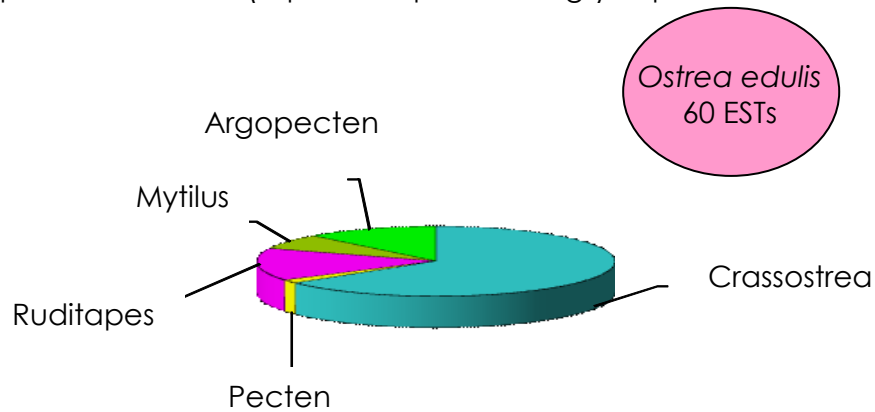
II.4.4.2 Priming

Des phénomènes de « priming response » (sensibilisation) ont été évoqués chez certains invertébrés. En effet, il a été mis en évidence que le vers de terre était capable de reconnaître et de rejeter des greffes venant d'autres vers de terre et ce de façon encore plus rapide lors de la seconde exposition (Cooper & Roch, 1986). Cependant, les bases de cette reconnaissance du soi ou non soi n'ont pas encore été élucidées.

Des travaux similaires ont été réalisés sur le mollusque gastéropode *Biomphalaria glabrata*, hôte intermédiaire dans la schistosomiose. En effet, des expériences ont été menées sur des individus (*B. glabrata*) exposés à des larves d'échinostomes irradiés (non-viables mais capables de pénétrer chez les hôtes mollusques). Ces mêmes individus ont été ensuite exposés une seconde fois à des larves non irradiées et ces individus devenaient réfractaires aux schistosomes (Lie *et al.*, 1975 ; Lie *et al.*, 1982). Sire *et al.* (1998) ont montré que des individus sensibles, infectés par *Schistosoma mansoni*, ne pouvaient pas être réinfectés une seconde fois. Ces

résultats illustrent la possibilité d'une protection durable contre la réinfection donc l'existence de priming chez ce mollusque et comparable aux autres invertébrés étudiés. Les approches moléculaires permettront de compléter les connaissances sur l'immunité chez les mollusques bivalves (**Figure 24**). Ces connaissances sont nécessaires à une meilleure compréhension du développement d'une maladie chez les mollusques bivalves.

Figure 24 : Répartition des ESTs (Express Sequences Tags) disponibles dans la base donnée NCBI



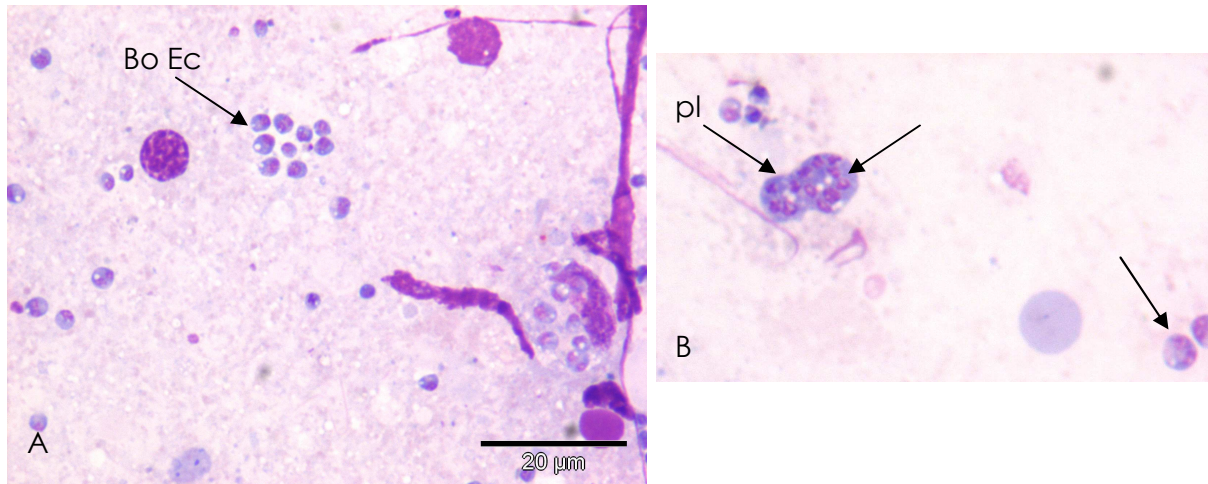


Figure 25 : (A) Observation du parasite *Bonamia ostreae* extracellulaire (Bo Ec) (x 1000). B Observation de plasmodes (pl) (x 1000). (Photos B. Chollet)

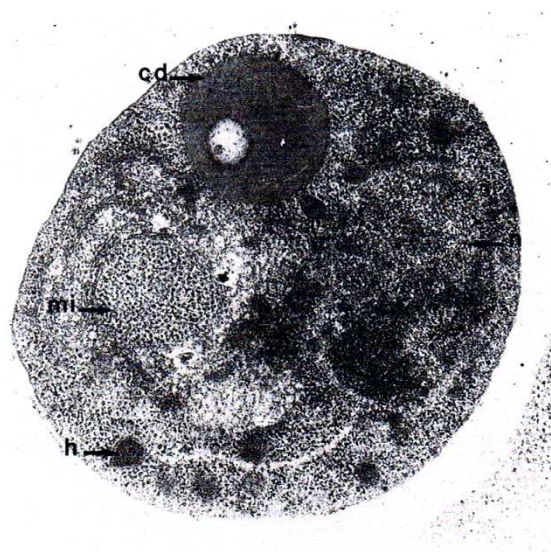


Figure 26 : Ultrastructure du parasite *Bonamia ostreae*. Cd :corps dense, n :noyau, mi :mitochondrie, h :haplosporosome microscopie électronique x 62500 JEOL JEM 1200 EX (Chagot, 1989)

III La bonamiose maladie due au parasite *Bonamia ostreae*

III.1 Le parasite *Bonamia ostreae*

Le parasite a été observé pour la première fois en 1979 en Europe à l'île Tudy en Bretagne en association à de fortes mortalités d'huîtres plates (Pichot *et al.*, 1980).

III.1.1 Morphologie et ultrastructure

Le parasite est le plus souvent observé à l'intérieur des hémocytes, mais il peut également être observé en position extracellulaire (**Figure 25**). La taille du parasite est comprise entre 2 et 4 µm de diamètre. Une fois phagocyté par les hémocytes, le parasite se trouve dans une vacuole parasitophore limitée par une membrane (Chagot, 1989). Deux formes du parasite ont été décrites : une forme claire et une forme dense (Pichot *et al.*, 1980). Les formes denses sont les plus répandues. Elles possèdent un noyau et présentent de nombreux ribosomes, des mitochondries, et des corps denses structurés (Comps, 1983) aussi appelés haplosporosomes. Les formes claires présentent des différences. Le noyau peut posséder un volumineux nucléole localisé en périphérie. Les mitochondries possèdent des crêtes plus nettes et plus nombreuses. Un autre type d'organite est représenté par des formes membranaires renfermées en saccules similaires à un appareil de Golgi. Des particules denses structurées ou PDS ont été identifiées dans les formes claires et denses. Les auteurs suggèrent que ces corps proviennent de lipides de l'hôte.

L'étude ultrastructurale d'un parasite proche, *Bonamia* sp., par Hine et Wesney (1994a, b) révèle la présence de corps lipidiques à la périphérie de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (**Figure 26**).

Les formes denses, souvent détectées dans les tissus très parasités, et les formes claires décrites dans des tissus faiblement parasités, ont été respectivement interprétées

comme des formes de résistance et des formes végétatives du parasite (Pichot *et al.*, 1980).

III.1.2 Distribution géographique

De fortes mortalités d'huîtres plates ont été détectées en Californie en 1963. Ces mortalités ont été associées à la présence de petits parasites, appelés microcell du fait de leur structure (Katkansky *et al.*, 1969). Ces formes ont été assimilées au parasite protozoaire *Bonamia ostreae* suite à l'analyse du parasite en microscopie électronique (Elston *et al.*, 1986).

Le parasite a été décrit pour la première fois en France en 1979 à l'île Tudy, puis cette parasitose s'est très vite répandue dans tous les sites ostréicoles français via des transferts d'huîtres entre bassins ostréicoles (Tigé *et al.*, 1982 ; Grizel, 1985). La prévalence peut varier d'un site à un autre de 10 à 70%. Le parasite *Bonamia ostreae* a touché très rapidement les pays européens producteurs tels que les Pays-Bas (Van Banning, 1987 ; Van Banning, 1991), le Danemark (Elston *et al.*, 1987), l'Espagne (Figueras, 1991), l'Angleterre et l'Irlande (Rogan *et al.*, 1991). Il a été également détecté dans l'état du Maine au Etats-Unis (Barber & Davis, 1994 ; Friedman & Perkins, 1994).

Plusieurs hypothèses ont été émises sur l'origine de l'émergence de ce parasite en France. Des études ont considéré notamment l'introduction du parasite par l'intermédiaire des eaux de ballast ou des huîtres collées sur les coques des bateaux, mais cette hypothèse n'a pas été retenue (Minchin *et al.*, 1993 ; Minchin & Sheehan, 1998 ; Hayes, 1998 ; Ruiz *et al.*, 2000). L'hypothèse la plus probable repose sur l'importation de naissain d'huîtres plates de Californie (Grizel 1985 ; Balouet *et al.*, 1983). Aujourd'hui, la bonamiose due à *Bonamia ostreae* est présente en Europe, en Amérique du nord et au Maroc.

D'autres parasites du genre *Bonamia* ont été mis en évidence dans différentes régions du monde. *Bonamia exitiosa* a été identifié en Europe, en Nouvelle-Zélande, au Chili, en Australie, en Argentine et en Caroline du Nord, USA (Campalans *et al.*, 2000; Hine *et al.*, 2001; Burreson *et al.* 2004 ; Kroeck et Montes, 2005 ; Corbeil *et al.* 2006), *B. roughleyi* en Australie (Farley *et al.*, 1988), *B. perspora* en Caroline du Nord, USA (Carnegie *et al.*, 2006).

III.1.3 Taxinomie

Les PDS ont été associées à des haplosporosomes décrits chez certaines haplosporidies (Perkins, 1979 ; Pichot *et al.*, 1980 ; Besnard, 2001). La description de ces corps a permis d'apparenter *Bonamia ostreae* à l'ordre des haplosporidiae. Cette hypothèse a été confirmée par le séquençage du gène codant l'ARN 18S (Carnegie *et al.*, 2000 ; Cochenec *et al.*, 2000 ; Reece *et al.*, 2004) et au phylum des cercozoaires (Cavalier-smith & Chao, 2003). La **figure 27** réalisée par Reece *et al.* (2004) montre que le parasite *B. ostreae* est présent dans l'ordre des haplosporidiae.

La récente identification du gène codant pour l'actine chez *Bonamia ostreae* a permis de confirmer sa position dans le groupe des haplosporidies (López-Flores *et al.*, 2007).

III.1.4 Cycle de développement et transmission

Actuellement, le cycle de développement et de transmission de *Bonamia ostreae* n'est pas complètement élucidé. Plusieurs stades de division ont été décrits en microscopie électronique correspondant à une multiplication schizogonique. Van Banning, (1990) a suggéré que le stade intrahémocytaire serait le stade final de la multiplication du parasite et a proposé un cycle d'infection qui passerait par les tissus ovariens. Cette hypothèse a été rejetée par Montes *et al.*, (1994), car il n'a pas été détecté de parasites dans la gonade, mais la présence de parasites dans les cellules épithéliales branchiales a été notée et serait liée, soit à l'entrée, soit à la sortie du parasite. La corrélation entre les lésions macroscopiques des branchies et la présence du parasite dans les cellules épithéliales est en faveur de l'hypothèse d'une sortie du parasite de son hôte au niveau des branchies. Cependant, il est possible que le parasite soit éliminé par les fèces car des lésions au niveau de l'épithélium stomacal ont été également observées (Comps, 1983).



Figure 27 : Classification phylogénétique de *Bonamia ostreae* sur la base de la séquence de la sous unité ribosomale de l'ADNr (Reece et al., 2004)

À la mort des animaux, il est envisageable qu'un grand nombre de parasites soit libéré dans le milieu par la dégradation des tissus. La transmission de l'infection par cohabitation entre des huîtres infectées et des huîtres saines a été montrée (Culloty *et al.*, 1999 ; Lallias *et al.*, 2009). Ce résultat suggère que le parasite n'a pas besoin d'hôte intermédiaire pour accomplir son cycle biologique. Cependant, plusieurs études ont porté sur le rôle d'hôtes intermédiaires ou vecteurs potentiels dans la transmission de la maladie, en particulier le rôle de la macrofaune (Culloty *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 2007). Lynch *et al.*, (2007) ont montré un rôle possible de l'ophiure *Ophitrix fragilis* dans le cycle biologique du parasite.

La mise au point d'un protocole de purification de parasite à partir d'huîtres fortement infectées a permis de reproduire la maladie en laboratoire (Mialhe *et al.*, 1988). Plusieurs auteurs ont effectué des infections expérimentales par injection de parasites purifiés soit intra-musculairement ou dans la cavité péricardique (Mialhe *et al.*, 1988 ; Martin *et al.*, 1993 ; Renault *et al.*, 1994 ; Hervio *et al.*, 1995 ; Culloty *et al.*, 1999 ; Lallias *et al.*, 2008).

Une dose infectieuse d'environ 100 000 parasites par injection semble nécessaire pour induire la maladie dans 50% des animaux testés âgés de 3 ans et maintenus 4 mois en laboratoire (Hervio *et al.*, 1995).

III.2 La maladie : la bonamiose

III.2.1 Période d'infection

Le parasite induit des mortalités toute l'année avec deux pics de mortalités à la fin de l'hiver et en automne (Culloty & Mulcahy, 1996). Il est généralement observé une forte mortalité en période hivernale (Figueras, 1991). Cependant, des expériences ont été menées afin de caractériser la ou les périodes d'infection. Tigé & Grizel (1984) et Grizel, (1985) ont montré que quelle que soit la période d'immersion d'huître plate dans une zone infectée, le parasite est détecté après trois à cinq mois. D'autres résultats similaires ont été obtenus dans d'autres pays européens comme l'Espagne et les Pays Bas (Montes *et al.*, 1991 ; Van Banning, 1990).

III.2.2 Espèces sensibles

L'hôte naturel du parasite protozoaire *Bonamia ostreae* est l'huître plate européenne *Ostrea edulis*. D'autres espèces huîtres (*O. puelchana*, *O. angasi* et *O. chilensis*) ont pu être infectées par ce parasite après immersion dans des zones où l'agent pathogène est endémique (Grizel *et al.*, 1983 ; Bougrier *et al.*, 1986 ; Pascual *et al.*, 1991). Une seule espèce *Crassostrea arakiensis* du genre *Crassostrea* est sensible au parasite en condition expérimentale (Pascual *et al.*, 1991 ; Cochenec *et al.*, 1998).

III.2.3 Facteurs biotiques et bonamiose

Les facteurs biotiques pouvant être impliqués dans le développement de la bonamiose sont l'âge de l'huître, la taille/poids et la période de maturation.

III.2.3.1 Age

Le parasite a été observé chez le naissain comme chez l'adulte, mais la mort de l'hôte intervient généralement à partir de deux ans d'âge, l'intensité de l'infection augmentant avec l'âge et la taille de l'huître (Balouet *et al.*, 1983 ; Caceres-Martinez *et al.*, 1995 ; Culloty & Mulcahy, 1996 ; Grizel 1985). Figueras, (1991) n'a observé aucune relation directe entre l'âge des huîtres et présence de la bonamiose, présence de cellules néoplasiques et infiltration hémocytaire. Cependant, les huîtres de moins d'un an restent peu parasitées (<3%) (Cochennec, 2001). Lallias *et al.*, (2008) ont démontré qu'il était possible d'induire de la mortalité chez des huîtres plates de moins d'un an placées en cohabitation avec des huîtres infectées après 6 mois d'expérimentation. L'infestation est plus significative après une première saison de reproduction, soit après deux d'âge (Culloty *et al.*, 2001).

III.2.3.2 Taille et poids

La bonamiose semble être une maladie taille-poids dépendante. Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer si une corrélation existait entre ces deux paramètres et la maladie (Culloty & Mulcahy, 1996 ; Figueras *et al.*, 1991 ; Caceres-

Martinez *et al.*, 1995 ; Montes *et al.*, 2003). Culloty & Mulcahy, (1996) ont montré que les huîtres de plus grandes tailles présentaient une prévalence plus faible tandis que Figueras *et al.*, (1991) ont observé de plus fortes mortalités chez les huîtres de grosse taille. De même, Montes *et al.*, (2003) ont rapporté des mortalités préférentiellement sur les plus grosses huîtres de 24 mois.

III.2.3.3 Période de maturation

Des études ont été réalisées durant la période de maturation des huîtres afin d'identifier si les huîtres matures présentaient des degrés d'infection supérieurs à des animaux non matures. Cochenec *et al.* (1992) n'observent aucune corrélation entre le développement de la gonade et le degré d'infection. Ce résultat réfute l'hypothèse émise par Van Baring (1990) proposant une phase du cycle du parasite dans les ovocytes, impliquant des taux d'infection plus élevés chez les femelles. Cependant, les femelles peuvent être plus vulnérables à la maladie durant cette période du fait de l'investissement de l'énergie dans la reproduction et non dans les mécanismes de défense. Il a été montré précédemment que les huîtres âgées de deux ans et plus présentent une prévalence plus forte. Néanmoins, Des animaux infectés mâles ou femelles sont capables de produire des gamètes viables.

III.2.4 Facteurs abiotiques et bonamiose

Parmi les facteurs abiotiques, il y a la salinité, l'oxygène et la température. Seule, la température semble avoir un impact sur développement de la maladie. Cependant, la récente étude d'Arzul *et al.* (2009) a montré que la salinité avait un impact sur la survie du parasite purifié.

III.2.4.1 Température

La température est un paramètre important chez les mollusques bivalves et de fortes variations de température peuvent induire des modifications du fonctionnement du système immunitaire chez les huîtres (Cheng, 1987). Cochenec *et al.* (2004) ont réalisé des analyses sur des lots d'huîtres plates injectées placées à différentes températures. Une basse température et des changements de températures

semblent affecter les mécanismes de défense des huîtres plates. Le développement de la maladie est plus rapide à basse température. Récemment, une étude réalisée sur la conservation du parasite purifié *Bonamia ostreae* a mis en évidence que le parasite conservé à 4°C présentait un meilleur taux de survie qu'à des températures plus élevées (Arzul *et al.*, 2009). Une basse température serait donc favorable au parasite et défavorable pour les huîtres.

III.2.4.2 Pratiques culturales et zootechniques

Suite à l'apparition du parasite *Bonamia ostreae* sur les côtes françaises, certaines recommandations concernant les pratiques d'élevage des huîtres plates ont été proposées afin de limiter l'impact de la bonamiose. En effet, des études ont permis de mettre en évidence qu'une réduction du nombre d'huîtres au m² permettait de diminuer l'impact du parasite sur les élevages (Contrat plan Etat-Région, 1984 et 1990).

La prévalence de la maladie et la mortalité des huîtres sont augmentées en lien avec la manipulation et le transfert des huîtres (Van Banning, 1991 ; Le Bec *et al.*, 1991). Les professionnels ont également observé que les huîtres plates *Ostrea edulis* mélangées avec des huîtres creuses *Crassostrea gigas* présentaient de meilleures performances zootechniques (Body *et al.*, 1991 ; Le Bec *et al.*, 1991).

III.2.5 Méthodes de diagnostic

La bonamiose est une maladie à déclaration obligatoire au niveau international et au niveau européen et des techniques de diagnostic sont préconisées dans un cadre réglementaire. Elles sont plus ou moins rapides et simples à mettre en œuvre et leurs applications dépendent du contexte de l'analyse.

L'histologie est utilisée comme technique de référence pour détecter le parasite, notamment dans le cadre du suivi des mortalités d'animaux (**Figure 28**).

L'apposition de tissus cardiaques ou de branchies est une technique rapide et simple à mettre en œuvre (**Figure 29**). Elle consiste à appuyer le tissu sur une lame propre et à colorer l'empreinte obtenue en coloration Hémacolor®.

Les branchies sont utilisées par défaut, lorsque le cœur est déjà trop dégradé (Hervio *et al.*, 1995), ou lorsque les prélèvements sont faits sur animaux vivants anesthésiés (biopsies).

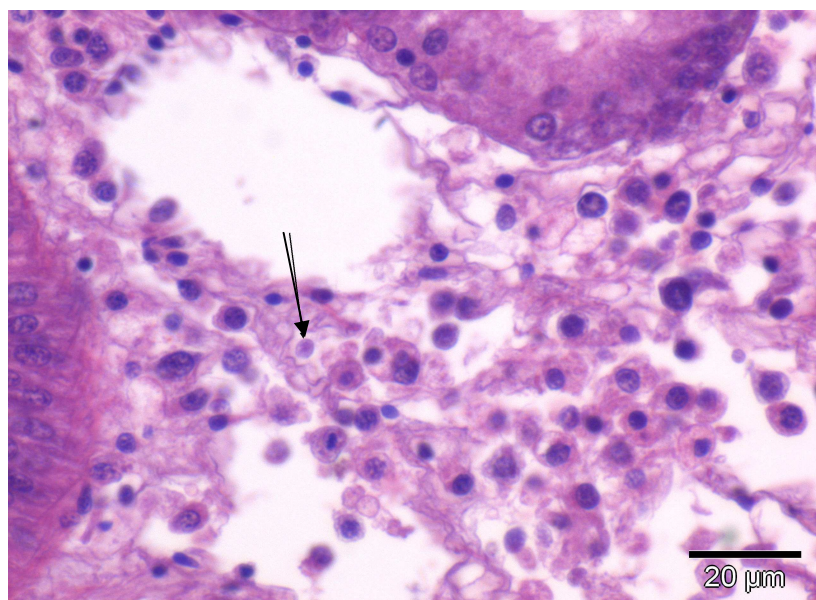


Figure 28 : Coupe histologique colorée à l'hématoxyline (x 600) (Photo B.Chollet)

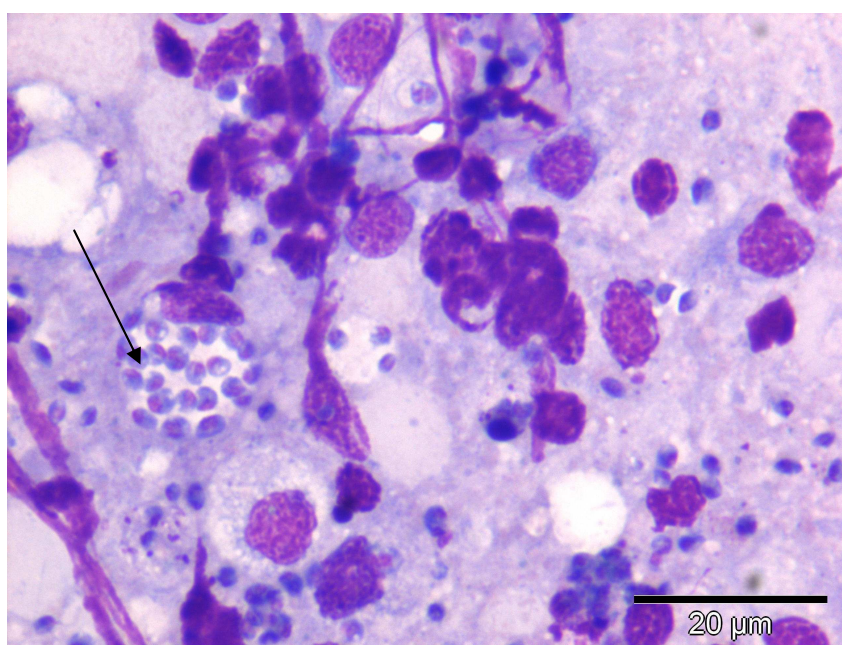


Figure 29 : Appositions de tissus cardiaque colorées à l'hémacolor® (x 1000) (Photos B.Chollet)

La technique de PCR RFLP permet de différencier certaines espèces de *Bonamia*. Une PCR est réalisée sur l'ADN extrait des échantillons à tester, et les produits obtenus sont ensuite digérés par deux enzymes de restriction : BglI et HaeIII. La taille des différents fragments obtenus sur le gel permet de différencier trois espèces de *Bonamia* : *Bonamia exitiosa*, *B. ostreae* et *B. roughleyi* (Cochennec et al., 2000 ; Hine et al., 2001). Récemment, une technique de PCR en temps réel a été mise au point afin de quantifier la charge parasitaire en ciblant un des gènes de l'actine du parasite *B. ostreae* (Robert et al., 2009).

III.3 Moyens de lutte contre la bonamiose

Les moyens de lutte contre la bonamiose restent limités. Ils sont basés essentiellement sur le contrôle sanitaire, la prophylaxie et l'amélioration génétique.

III.3.1 Prophylaxie et contrôle sanitaire

Les huîtres plates étant dépourvues de réponse immunitaire spécifique, il n'est pas possible de développer la vaccination sur les animaux pour les protéger de la bonamiose. L'utilisation de traitements médicaux est en général impossible en raison des conditions d'élevage (Grizel, 1989).

Le contrôle de la maladie repose en particulier sur des restrictions de transfert d'animaux infectés vers des zones indemnes de parasite. Ces mesures sont définies par des textes réglementaires aux échelles nationale, européenne et internationale.

III.3.2 Amélioration génétique

Des animaux appartenant à une même espèce peuvent présenter des sensibilités différentes vis à vis d'une maladie. Ces différences peuvent être liées aux conditions environnementales, l'état physiologique de l'animal ou bien à l'héritabilité de caractères génétiques. L'amélioration génétique vise en particulier à sélectionner des animaux résistants à une maladie. L'amélioration génétique a été largement

étudiée chez différentes espèces conchylicoles afin d'obtenir des populations résistantes à certaines maladies. Chez *Crassostrea virginica*, une population résistante au parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX) a été isolée dans les années 1970 au Etats-Unis. (Haskin & Ford, 1978, 1979). Chez *Saccostrea glomerata*, l'huître australienne, des programmes de sélection ont permis d'obtenir une population résistante aux parasites *Marteilia sydneyi* et *Bonamia roughleyi* (Nell et al., 2000 ; Green et al., 2009 ; Newton et al., 2004).

Des travaux d'amélioration génétique ont été entrepris chez *Ostrea edulis* afin d'obtenir des animaux résistants à *Bonamia ostreae*. Contrairement au programme de sélection réalisé chez *Saccostrea glomerata*, *Crassostrea virginica*, le programme de sélection entrepris par l'Ifremer en 1985 a fait appel à une pression de sélection par infection expérimentale (Mialhe et al., 1988 ; Hervio, 1992 ; Culloty & Mulcahy, 1992). Après plusieurs générations et des années de sélection massale, le taux de survie des huîtres plates sélectionnées est supérieur à celui des huîtres non sélectionnées (Martin et al., 1993 ; Naciri, 1994 ; Baud et al., 1997 ; Naciri-Graven et al., 1998). Bédier et al. (2001) ont montré que les taux de prévalence de *B. ostreae* étaient corrélés aux taux de survie. Le suivi de paramètres hématocytaires en cytométrie en flux a permis de mettre en évidence des différences d'activités de type estérase et de production des EORs entre les huîtres sélectionnées et celles non sélectionnées. Plus récemment, des QTLs liés à la résistance à la bonamiose ont été identifiés dans le cadre d'une infection expérimentale sur deux groupes d'huîtres plates présentant des niveaux de survie contrastés (Lallias et al., 2009).

IV Système hôte-parasite, interactions durables

Un parasite est un organisme « pique-assiette » qui vit aux dépens d'un autre être vivant (hôte) dont il tire sources d'énergie, moyens de transport et protection vis à vis du milieu extérieur (**Figure 30**).

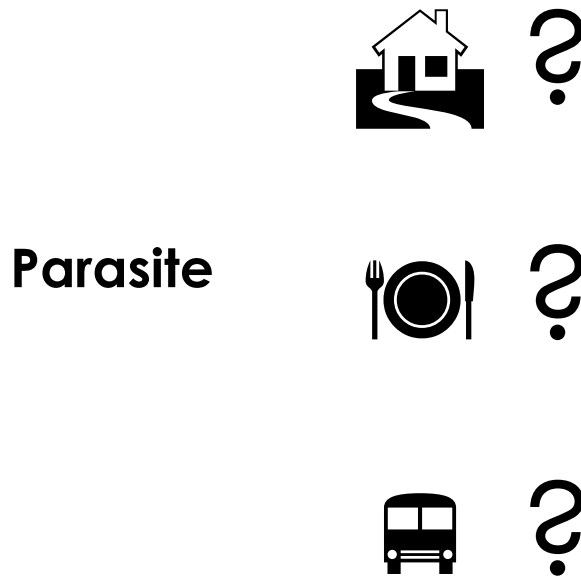


Figure 30 : Quels avantages à une vie parasitaire ? (modifié d'après Combes, 1995)

Le système hôte-parasite est un écosystème particulier à durée de vie limitée, le parasite exploitant les ressources de son hôte. Cette relation obligatoire pour le parasite s'établit aux niveaux spatio-temporel et énergétique et se fait au détriment de l'hôte. Le parasitisme se différencie ainsi des autres types d'interactions durables comme l'épibiose ou la phorésie (support ou transport), l'inquilinisme (habitat), le commensalisme et le mutualisme (ressources).

IV.1 Parasitisme

Le parasitisme est fondé sur un équilibre dynamique entre l'hôte et le parasite qui ne peut pas être rompu. Ainsi, seule la mort de l'hôte ou du parasite peut mettre fin à cette association. Cela distingue les parasites des parasitoïdes qui tuent leur hôte (situation intermédiaire entre le parasitisme et la prédation) pour favoriser leur propre survie.

Les relations entre hôte et parasite qui définissent les modalités d'un parasitisme sont souvent très complexes. Elles font intervenir des mécanismes adaptés aussi bien pour prolonger la survie d'un parasite au sein de son hôte que limiter ou arrêter le développement du parasite chez l'hôte.

IV.1.1 Transmission parasitaire

Les parasites ne peuvent survivre que s'ils se trouvent ou aboutissent, activement ou passivement dans un habitat favorable (hôte). Les parasites font appel à plusieurs modes de transmission pour passer d'hôte en hôte de manière à découvrir et exploiter plusieurs milieux.

La transmission parasitaire d'un hôte à un autre hôte peut se faire par quatre procédés principaux :

- la transmission par contact,
- la transmission par consommation,
- la transmission par vecteur piqueur,
- et la transmission par stade libre actif.

IV.1.2 Cycle parasitaire et implication d'un ou plusieurs hôtes

Le cycle parasitaire est l'ensemble d'une succession de transformations obligatoires subies par un parasite pour passer d'une génération à une autre. L'achèvement du cycle parasitaire peut faire intervenir plusieurs hôtes successifs. On définit ainsi ce cycle par le terme « hétéroxène », c'est le cas chez *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* et *Schistosoma mansoni*. En revanche, un cycle parasitaire se déroulant

chez un seul hôte est dit « monoxène ». Parmi les parasites à cycle monoxène, nous pouvons citer *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* et *Entamoeba histolytica*.

IV.2 Interactions durables : le système hôte-parasite

Les interactions durables entre un hôte et un parasite sont complexes et font intervenir une multitude de caractères permettant la rencontre et la compatibilité. L'établissement d'un système hôte-parasite est le résultat de la combinaison de ces caractères.

IV.2.1 Rencontre et compatibilité

Les parasites n'exploitent qu'un petit nombre d'espèces parmi toutes celles qui sont disponibles. Au sein d'un même écosystème, il existe des disparités, car le parasite peut ne pas exploiter l'ensemble des espèces vivant au sein de cet écosystème (incompatibilité d'espèces), ni même certains membres d'une même espèce, on peut parler alors de résistance.

L'établissement d'un système hôte-parasite peut se décomposer en quatre processus, ou filtres, permettant de faire le tri des espèces pouvant potentiellement devenir hôte d'un parasite.

-1 Les hôtes ne sont pas présents dans le même écosystème que le parasite (se trouve en dehors de la « limite de la biocénose »).

-2 Le comportement des hôtes est tel que le contact avec les stades infestant du parasite est impossible (ne franchissent pas le « filtre éthologique »).

-3 Les hôtes potentiels ne conviennent pas aux exigences d'espèces ou de ressources métaboliques du parasite (exclusion de « l'angle d'exigence » du parasite).

-4 Les hôtes sont capables de détruire le parasite par leur système immunitaire ou autres procédés d'élimination du parasite (exclusion du parasite par « l'angle d'évasion immunitaire »).

Les deux premiers processus (1 et 2) conditionnent la possibilité de contact ou filtre de rencontre. Les processus 3 et 4 peuvent être regroupés ensemble pour former le filtre de compatibilité.

En résumé, nous pouvons établir que quatre obstacles doivent être franchis pour qu'un système « hôte-parasite » soit établi (**Figure 31**).

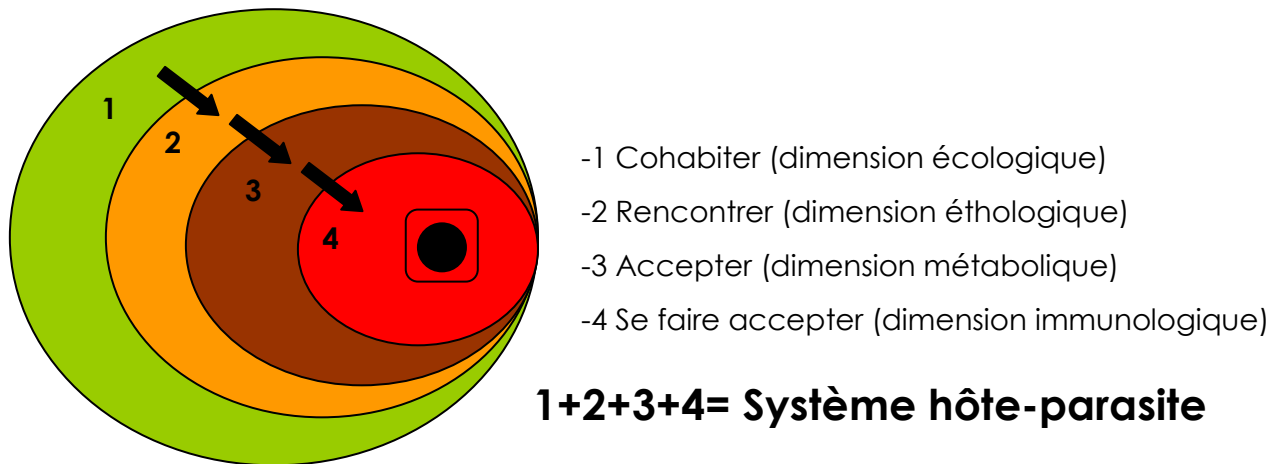


Figure 31 : Quatre obstacles à la réalisation d'un système hôte-parasite

Parmi ces quatre obstacles, nous ne pouvons pas mesurer l'importance de l'un par rapport aux autres, car si l'un d'entre eux n'existe pas ou ne peut pas être franchi, alors ce système « hôte-parasite » ne peut pas exister de façon durable.

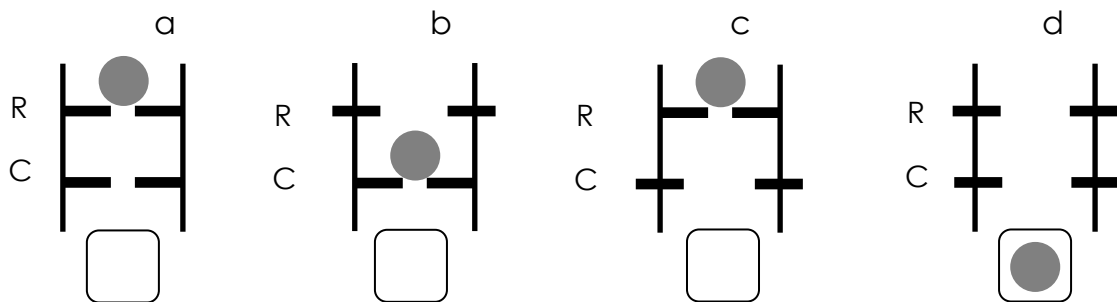


Figure 32 : Etude des différents cas possible dans l'établissement d'un système hôte-parasite (Combes, 1995).

IV.2.2 Course aux armements

L'établissement d'un système hôte-parasite induit des pressions de sélection sur le génome de l'hôte et du parasite. L'existence de deux filtres (rencontre et compatibilité) implique une sélection sur chaque filtre (**Figure 32**).

Le filtre de rencontre sélectionne :

- Les parasites qui possèdent la meilleure aptitude à rencontrer des hôtes compatibles. Nous parlerons donc de « **gènes de rencontre** » ;
- Les hôtes dont le comportement tend à s'opposer à la rencontre des parasites, dans ce cas, nous parlerons de « **gènes d'évitement** ».

Le filtre de compatibilité sélectionne ;

- les hôtes qui procurent au parasite l'environnement le plus défavorable, notamment l'environnement hostile dû aux mécanismes immunitaires, implication de « **gènes de défense** ».
- les parasites qui possèdent la meilleure aptitude à s'adapter à cet environnement notamment à échapper à l'immunité. Nous parlerons donc de « **gènes de survie** ».

Enfin, si tous ces critères de sélection sont en faveur du parasite, le système hôte-parasite est établi, mais cela ne veut pas signifier que le succès du parasite est assuré. Le parasite doit développer des mécanismes lui permettant de se maintenir et de survivre dans son hôte, nous parlerons de « **gènes d'exploitation** ».

IV.3 Se faire accepter, exploiter et se multiplier

Se faire accepter par l'hôte sans se faire détruire est la dernière barrière à franchir pour un parasite si le filtre de rencontre est ouvert. La capacité de l'hôte à lutter contre l'invasion du parasite repose essentiellement sur la réponse immunitaire. Les parasites (protozoaires) sont capables d'échapper aux mécanismes de l'immunité humorale et cellulaire de l'hôte. Les parasites sont capables de franchir les barrières de leur hôte afin de trouver des conditions favorables à leur développement. Pour

cela, ils sont capables de déjouer les mécanismes de défense mis en jeu par leurs hôtes afin de s'y multiplier. Parmi toutes les stratégies mises en place, la discrétion et le camouflage sont les principales stratégies observées chez les parasites protozoaires.

IV.3.1 Parasites intracellulaires chez les vertébrés et *Bonamia ostreae*

IV.3.1.1 Entrer sans frapper dans la cellule hôte

Les parasites existent dans pratiquement toutes les niches écologiques, mais aucune n'est aussi spécialisée que celui du parasite intracellulaire obligatoire qui doit pénétrer dans les cellules de son hôte pour survivre. La plupart des parasites intracellulaires sont des protozoaires dont beaucoup sont responsables de maladies mortelles chez les animaux et l'homme. Les défenses que doivent franchir ces parasites sont multiples (peau, muqueuses, tissus conjonctifs, et système immunitaire). Surmonter l'ensemble de ces défenses et franchir le dernier obstacle imposé qu'est la membrane cellulaire est un formidable défi pour les parasites. De plus, une fois à l'intérieur de la cellule, les parasites ont développé des stratégies de contournement des défenses cellulaires et d'installation afin de survivre.

Les parasites qui pratiquent ce style de vie ont généralement renoncé à la capacité de croissance extracellulaire, ce qui les rend vulnérables hors de la cellule.

Les parasites protozoaires ont développé diverses stratégies pour entrer dans les cellules de leur hôte. Les leishmanies utilisent la phagocytose pour entrer dans la cellule hôte tandis que les plasmodiums et les toxoplasmes entrent dans la cellule de façon active par pénétration (Sacks & Sher, 2002 ; Sibley, 2004).

IV.3.1.1.1 *Leishmania sp.*

Les leishmanies utilisent la phagocytose pour pénétrer dans la cellule hôte. Les leishmanies ne disposent pas des mécanismes nécessaires à l'invasion active et se limitent plutôt à l'utilisation de cellules expertes dans la phagocytose, principalement les macrophages, avec quelques exceptions (par exemple, les fibroblastes) (Rittig &

Bogdan, 2000). L'internalisation des leishmanies par les macrophages se fait par l'intermédiaire de récepteurs classiques impliqués dans la phagocytose qui implique une diversité des récepteurs de reconnaissance tels que le CR3, les récepteurs CR1 fucose et le mannose (Alexander & Russell, 1992) (**Figure 33** et **Tableau 3**). La phagocytose des leishmanies induit une participation active de l'actine de l'hôte.

IV.3.1.1.2 *Trypanosoma cruzii*

Les trypomastigotes du parasite *Trypanosoma cruzii* pénètrent dans le macrophage et tous les types de cellules en induisant un recrutement des lysosomes à la membrane plasmique. Après fixation à la membrane de la cellule hôte, les signaux déclenchés par le parasite peuvent engager le processus d'entrée progressive dans la cellule hôte (Rodríguez *et al.*, 1996) (**Figure 34**). L'internalisation du parasite mobilise certains récepteurs comme le TGF- β (Transforming Growth Factor) et des protéines de type G. La mobilisation de l'actine dans l'internalisation n'est pas nécessaire (**Tableau 3**).

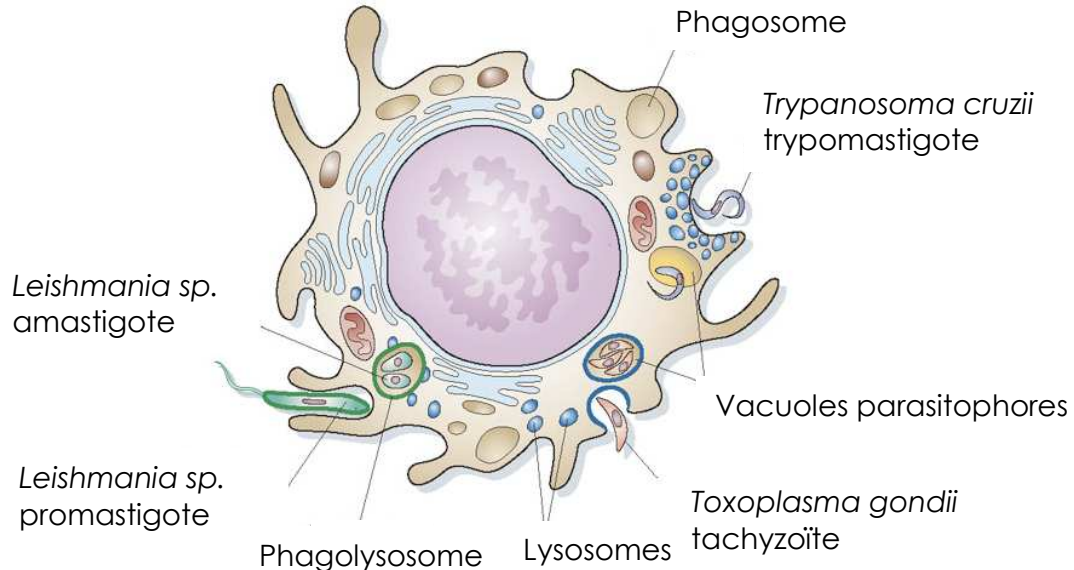


Figure 33 : Exemples d'internalisation de parasite intracellulaire dans une cellule de type macrophage (modifié d'après Sacks & Sher, 2002).

| Propriétés | Parasites intracellulaires | | |
|-------------------------------------|----------------------------|--|------------------------|
| | <i>Leishmania sp.</i> | <i>Trypanosoma cruzii</i> | <i>Toxoplasma sp.</i> |
| Types cellulaires | Macrophage | Tous | Tous |
| Récepteurs | CR1 et CR3 | G-protein TGF-β | GAGs Acide sialique |
| Mécanisme de pénétration | Phagocytose | Voie calcique Recrutement des lysosomes | Pénétration directe |
| Implication de l'actine de l'hôte | Oui | Non | Oui |
| Implication de l'actine du parasite | Non | Non | Oui |
| Situation dans la cellule | Phagolysosome | Vacuole lysosomale | Vacuole parasitophore |

Tableau 3 : Exemples de parasites intracellulaires : stratégies de pénétration intracellulaire (modifié d'après Sibley, 2004)

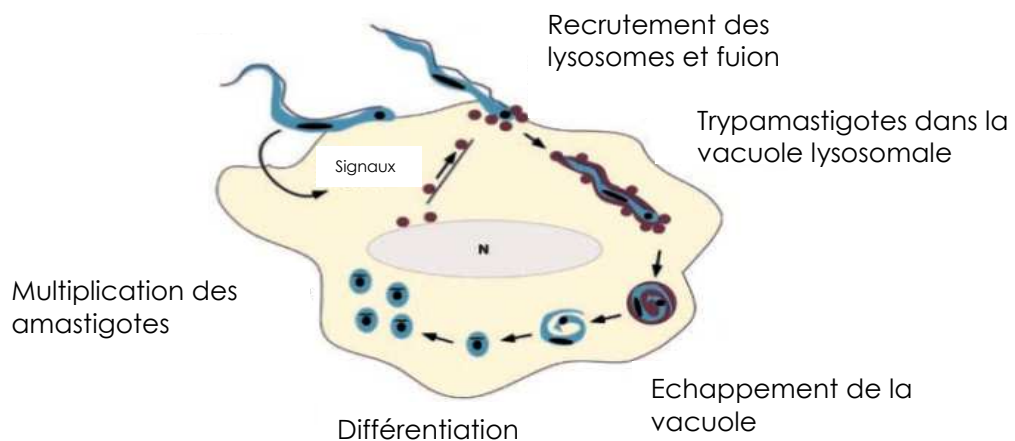


Figure 34 : Pénétration de *Trypanosoma cruzii* dans la cellule hôte

IV.3.1.1.3 *Toxoplasma sp.* et *Plasmodium sp.*

La motilité invasive des sporozoïtes de *Plasmodium sp.* ou des tachyzoïtes de *Toxoplasma sp.* est basée sur des mécanismes conservés chez les apicomplexes, tels que la motilité par glissement. Les formes invasives de *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* sont motiles. La motilité et l'invasion sont intimement liées. Les parasites non-motiles sont incapables de pénétrer dans une cellule. Ce mécanisme permet au parasite de pénétrer dans tous les types cellulaires. A cela s'ajoute un manque de spécificité. En effet, les toxoplasmes et les plasmodiums sont capables d'envahir tous les types cellulaires des vertébrés à sang chaud, les cellules de poissons, et même les cellules d'insectes. La motilité par glissement des parasites apicomplexes n'implique pas de modifications dans la forme des cellules. Leurs mouvements ne se fondent pas sur l'utilisation de flagelles ou de cils, mais plutôt sur l'existence d'organelles apicales cytoplasmiques, appelées les micronèmes (**Figures 33 et 35**). Les micronèmes contiennent des protéines adhésives (adhésines), qui sont sécrétées par le pore apical de la cellule et ensuite redistribuées vers l'arrière le long de la surface de la cellule (Dubremetz *et al.*, 1998 ; Carruthers & Sibley, 1999 ; Opitz & Soldati 2002). Par conséquent, leur motilité est substrat dépendant. En plus de la sécrétion d'adhésine, l'invasion des cellules hôtes par le toxoplasme est dépendante de l'actine et de la myosine du parasite et de l'hôte (**Tableau 3**) (Morisaki *et al.*, 1995 ; Dobrowolski *et al.*, 1997a, 1997b ; Gonzalez *et al.*, 2009).

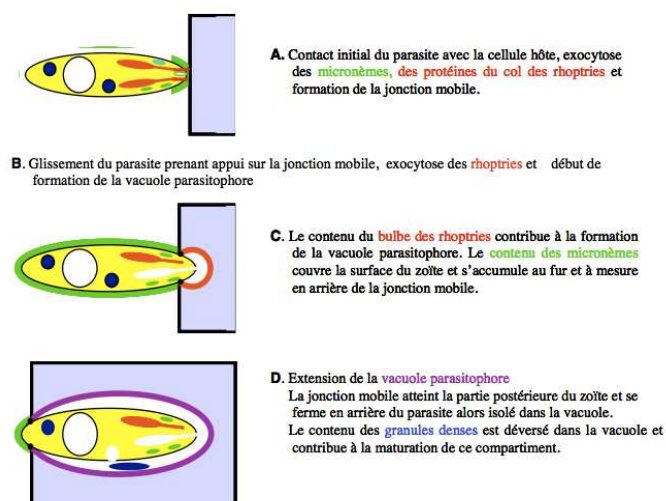


Figure 35 : Représentation schématique des principales étapes de l'invasion des tachyzoïtes de *Toxoplasma* dans la cellule hôte.

IV.3.1.1.4 *Bonamia ostreae*

Les mécanismes de pénétration du parasite sont moins documentés que chez les parasites précédemment décrits. Cependant, la mise au point du protocole de purification du parasite (Mialhe *et al.*, 1988) et de prélèvement d'hémolymphe a permis d'entreprendre l'étude des interactions entre les hémocytes d'huître et les parasites *in vitro* (Mourton *et al.*, 1992 ; Chagot *et al.*, 1992). Les résultats de ces expériences ont montré que le parasite était internalisé, puis persistait dans les hémocytes d'huître plate (Chagot *et al.*, 1992). Cette étude rapporte aussi que l'internalisation du parasite est diminuée en présence de cytochalasine B. Cette observation indique une implication possible du parasite dans sa propre internalisation. Il a aussi été montré que les hémocytes traités avec des sucres simples (mannose, glucose, fucose, N-acétyl glucosamine et galactosamine) conservaient la capacité de phagocytose. Des récepteurs de type lectine ne semblent donc pas impliqués dans l'internalisation du parasite. En revanche, le traitement du parasite avec des sucres avant la mise en contact a montré une diminution du taux d'infection des hémocytes. Il semblerait donc que le parasite possède à sa surface des molécules de type lectine qui seraient impliquées dans sa reconnaissance par les hémocytes (Chagot, 1989).

IV.3.1.2 « Tenue correcte exigée » pour ne pas se faire dégrader

Après internalisation, les parasites vont réorganiser la cellule hôte et interférer avec les mécanismes de défense de l'hôte afin de se protéger et de s'installer.

IV.3.1.2.1 *Remodelage intracellulaire après internalisation*

Les parasites protozoaires sont adaptés à un mode de vie intracellulaire et doivent résister aux mécanismes de défense qui peuvent être induits dans les cellules phagocytaires et non-phagocytaires. Après internalisation, les parasites sont soumis à un environnement hostile par la présence de lysosomes capables de produire ou libérer des enzymes hydrolytiques et des EOR. Pour contrer cela, les parasites ont développé un système basé sur un remodelage intracellulaire.

Toxoplasma gondii est situé dans un phagosome, le parasite va se protéger par la formation d'une vacuole parasitophore liée à l'absence de fusion avec les endosomes et les lysosomes (Mordue *et al.*, 1999 ; Lingelbach & Joiner, 1998). Ce remodelage semble être crucial pour l'inhibition de l'acidification des vacuoles parasitophores et de la fusion des lysosomes.

L'internalisation du parasite *Trypanosoma cruzii* induit un recrutement des lysosomes à la périphérie de la cellule (Rodriguez *et al.*, 1995, 1996, 1997). Les lysosomes vont servir à la construction de la vacuole parasitophore qui est acide (Tardieux *et al.*, 1992). Le parasite ne peut pas se développer dans la vacuole parasitophore. Il sort de la vacuole parasitophore grâce à la sécrétion de molécules telles que la molécule Tc-TOX qui va former des pores sur la membrane de la vacuole parasitophore. La sécrétion de cette molécule sera facilitée par la présence de trans-sialidase présent à la surface des trypomastigotes. Le parasite libre dans le cytoplasme va poursuivre son développement dans la cellule hôte (Andrews *et al.*, 1990 ; Hall *et al.*, 1992). Une voie lysosome-indépendante a également été décrite au cours de l'invasion de *T. cruzii* (Woolsey *et al.*, 2003). Ce mécanisme d'entrée consiste, quant à lui, à induire une invagination de la membrane plasmique de la cellule hôte et à la formation d'une vacuole d'origine plasmique, initialement dépourvue de lysosome (Woolsey *et al.*, 2003). La vacuole contenant les trypomastigotes subit alors un processus de maturation au cours duquel elle acquiert progressivement des lysosomes (Woolsey *et al.*, 2003).

Les leishmanies ne semblent pas remodeler le phagosome d'une manière importante car la membrane du phagosome se dissout rapidement avec un recrutement tardif des lysosomes. Ce recrutement tardif des lysosomes est principalement dû à une inhibition de la maturation du phagosome par le lipophosphoglycan (LPG). Les promastigotes ont alors le temps de se différencier et de devenir eux-mêmes résistants aux hydrolases (Desjardins & Descoteaux, 1997 ; Dermine *et al.*, 2000).

Les parasites du genre *Bonamia* remodeleraient la vacuole parasitophore par le déchargement de corps lipidiques. Le parasite utiliserait la vacuole parasitophore pour décharger ces corps lipidiques ce qui modifierait les propriétés membranaires

du phagosome (Hine & Wesney, 1994a). Cette modification empêcherait une fusion entre le phagosome et le lysosome et ainsi une non-dégradation du parasite.

IV.3.2.1.2 Manipulation du système immunitaire de l'hôte par le parasite

Les macrophages possèdent des mécanismes de défense primaire comme l'activation du métabolisme oxydatif. La NADPH oxydase est une enzyme qui catalyse le transfert des électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire aboutissant à la production de superoxyde et d'EOR.

Des études *in vitro* ont permis de montrer que le parasite *Plasmodium sp.* était capable d'interférer avec la production d'EOR en produisant une molécule, l'hémozoïne, durant l'infection (**Figure 36**) (Schwarzer *et al.*, 1992). L'inhibition de la production d'EOR serait due à une inhibition de la production de la protéine kinase C (PKC) (Schwarzer *et al.*, 1993). La protéine kinase C (PKC) et des protéines tyrosine kinases (PTKS) sont impliquées dans la régulation des fonctions des phagocytes en réponse à une variété de stimuli extracellulaires.

Les leishmanies sont capables d'éviter la production d'EOR par une inhibition de la PKC (**Figure 36**) (Olivier *et al.*, 1992 ; Descoteaux *et al.* 1992). Le lipophosphoglycan (LPG) présent à la surface des leishmanies est impliqué dans l'inhibition de la PKC.

Bonamia ostreae semble être capable d'inhiber la production d'EOR par la présence d'activités spécifiques (acide phosphatase, cytidine monophosphatase et thiamine pyrophosphatase) et d'enzymes (catalase et peroxydase) (Hervio, 1992).

En plus de leurs réponses innées, les macrophages peuvent activer des cascades de production de cytokines. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence que les protozoaires intracellulaires peuvent interférer avec la production de cytokines. Les macrophages infectés par des leishmanies sont incapables de produire l'interleukine 12 (IL-12) (McDowell & Sacks, 1999). L'IL-12 est l'inducteur principal de l'interféron gamma (IFN- γ). L'excès d'IL-12 peut entraîner des lésions graves des tissus préjudiciables au parasite en bloquant son cycle de transmission.

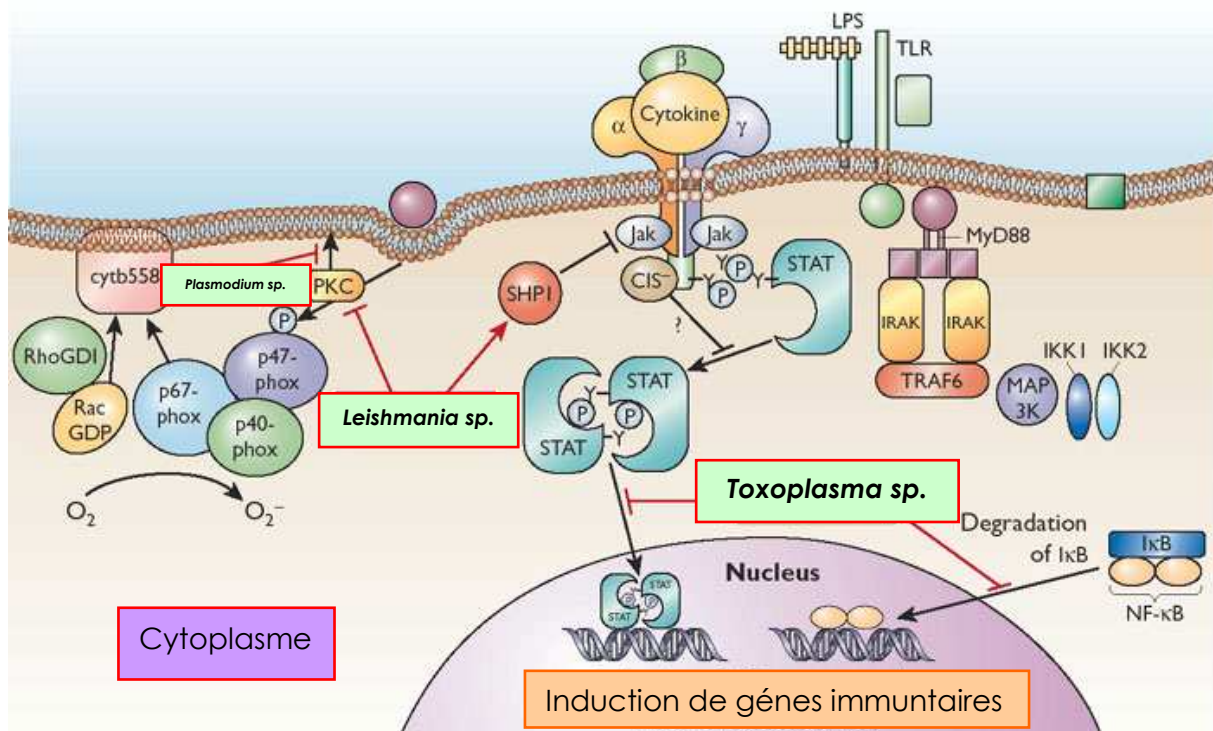


Figure 36 : Inhibition des voies de signalisation chez les macrophages infectés par *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.* et *Toxoplasma sp.* (modifiée d'après Sacks & Sher 2002).

De plus, les leishmanies inhibent la voie de signalisation Jak-STAT par l'intermédiaire de protéines tyrosine kinases (**Figure 36**) (Nandan & Reiner, 1995). L'inhibition de la voie Jak-STAT est due à une non-phosphorylation de Jak2 par une activation rapide d'une protéine cytoplasmique phosphatase (SHP) (Blanchette *et al.*, 1999). La voie de signalisation Jak-STAT est impliquée dans un large éventail de réponses des macrophages comme l'induction de la plupart des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α), IL-1 β et l'induction de l'oxyde nitrique (iNOS). Un mécanisme similaire a été décrit chez les macrophages de souris infectés par le parasite *Plasmodium berghei*. En effet, le parasite inhibe la production de l'IL-12 (Xu *et al.*, 2001).

Contrairement aux leishmanies et aux plasmodiums, le parasite *Toxoplasma gondii* interfère avec la voie de signalisation NF- κ B (Butcher *et al.*, 2001 ; Shapira *et al.*, 2002) (**Figure 36**). Cette voie joue un rôle important dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative tels que l'IL-12, l'IFN- γ , le TNF- α , l'iNOS ainsi que des molécules d'adhésion. Les macrophages infectés par *T. gondii* subissent une dégradation rapide de l'I κ B, ce qui traduit une non-translocation vers le noyau. *T. gondii* induit une inhibition plus généralisée par l'IL-12 et le TNF- α . Une étude a permis de montrer que l'utilisation de souches virulentes de *T. gondii* induisait une diminution de la production de l'iNOS (Dobbin *et al.*, 2002). De plus, *T. gondii* inhibe lui aussi la voie de signalisation Jak-STAT par une perturbation le transport nucléaire de STAT- α (**Figure 36**) (Dobbin *et al.*, 2002).

Enfin, les protozoaires parasites ont développé des stratégies pour moduler les voies de signalisation de l'apoptose des macrophages afin de maintenir leur survie dans la cellule hôte (Lüder *et al.*, 2001). Les leishmanies et les toxoplasmes inhibent la voie de signalisation de l'apoptose, puis induisent une augmentation de l'expression de Bcl-2 (Moore *et al.*, 1994 ; Nash *et al.*, 1998).

III.3.2 Interactions entre parasite et mollusques bivalves

Par rapport aux modèles de parasites de vertébrés développés précédemment, les interactions entre mollusques bivalves et protozoaires sont peu documentées. Dans ce paragraphe, deux parasitoses sont présentées : la marteliose due au parasite *Marteilia sydneyi* chez l'huître australienne *Saccostrea glomerata* et la perkinsose due au parasite *Perkinsus marinus* chez l'huître américaine *Crassostrea virginica*.

IV.3.2.1 *Perkinsus marinus* et *Crassostrea virginica*

Le parasite protozoaire *Perkinsus marinus* est un parasite intracellulaire facultatif des mollusques bivalves. La première description de *P. marinus* a été faite en 1950 par Mackin, en Louisiane (Etat-Unis), en association à des mortalités massives de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*. Le parasite incriminé a été nommé dans un premier temps « *Dermocystidium marinum* », puis « *Labyrinthomyxa marina* » et finalement *Perkinsus marinus*. *P. marinus* induit la maladie appelée « dermo » dans les élevages d'huîtres (*C. virginica*) le long des côtes atlantiques et du Golfe du Mexique (Ford 1996 ; Ford & Chintala, 2006 ; Ford & Smolowitz, 2007).

Le cycle de vie de *Perkinsus marinus* comprend une étape de vie libre-mobile (zoospore), un stade végétatif non-mobile (trophozoïte) et des hypnospores. Le parasite est ingéré par l'hôte, puis phagocyté par les hémocytes présents dans le tube digestif.

De nombreuses études ont été réalisées sur ce modèle afin de décrire les interactions entre l'huître américaine *Crassostrea virginica* et son parasite *Perkinsus marinus*.

Les produits extracellulaires (ECP) de cultures de *Perkinsus marinus* présentent des activités de type sérine protéase (La Peyre *et al.*, 1995a ; Faisal *et al.*, 1999). Cette protéase pourrait inhiber la production de molécules cytotoxiques par les hémocytes telles que le lysozyme et les ions peroxydes. (La Peyre *et al.*, 1995b ; Chu & La Peyre, 1989 ; Fisher *et al.*, 1986). Les trophozoïtes phagocytés restent viables notamment

par inhibition de la production d'EOR produit par l'hôte et grâce à la présence de mécanismes antioxydants développés par le parasite (Volety & Chu, 1995 ; Alavi *et al.*, 2009). Une étude a permis d'identifier une galectine présente à la surface des hémocytes impliquée dans la reconnaissance de *P. marinus* trophozoïte (Tasumi & Vasta, 2007 ; Vasta, 2009). Tanguy *et al.* (2004), avait déjà émis l'hypothèse de la participation d'une lectine de type galectine (beta galactoside binding lectine) dans la reconnaissance du parasite.

Une approche moléculaire a permis d'identifier une sérine protéase de *Perkinsus marinus* (Brown & Reece, 2003). Une approche transcriptomique réalisée par Tanguy *et al.* (2004) a permis d'identifier des ESTs potentiellement exprimées en réponse à l'infection par *P. marinus* chez *Crassostrea virginica* et notamment une EST codant pour la perméine ou cavortine. Il s'agit d'une protéine glycosylée présentant une activité d'inhibiteur de sérine protéase. Cette protéine peut fonctionner comme un chélateur du fer et donc inhiberait la croissance de *P. marinus* (Gauthier & Vasta, 1994). Plus récemment, un inhibiteur de sérine protéase (cvSI-1) a été identifié et purifié chez *C. virginica*. CvSI-1 inhibe la prolifération du protozoaire parasite *P. marinus in vitro*. Les hybridations *in situ* ont permis de localiser cvSI-1 dans les cellules basophiles des tubules digestifs. L'analyse du niveau d'expression du gène cvSI-1 a montré que le niveau d'expression est plus élevé dans les huîtres sélectionnées contre la maladie que chez les huîtres non sélectionnées (Xue *et al.*, 2010).

Hughes *et al.*, (2010) ont montré que *Perkinsus marinus* module l'apoptose des hémocytes. Ces auteurs ont observé une augmentation de l'apoptose au début de l'infection aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Une autre étude a montré la suppression de l'apoptose dans les hémocytes des huîtres naturellement infectées par *P. marinus* (Sunila & La Banca, 2003), tandis que d'autres auteurs ont rapportés une inhibition de l'apoptose après 1 h d'incubation des hémocytes d'huîtres avec *P. marinus* (Goedken *et al.*, 2005). L'étude réalisée par Hughes *et al.* (2010) a permis de décrire le mécanisme moléculaire suspecté dans la modulation de l'apoptose des cellules infectées par le parasite *P. marinus*. Les parasites intracellulaires des vertébrés tels que *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzii* et *Leishmania donovani*, stimulent ou inhibent l'apoptose par l'activation et l'inhibition de la caspase 3 (Heussler *et al.*, 1999 ; Heussler *et al.*, 2001). Hughes *et al.* (2010) suggère que les caspases ne soient

pas impliquées dans l'apoptose accrue observée dans les étapes initiales de l'infection, et qu'elles ne sont pas inhibées par *P. marinus* dans les hémocytes d'huîtres. La non-implication des caspases dans l'activation de l'apoptose par *P. marinus* est une caractéristique unique des hémocytes d'huîtres qui les différencient de la plupart des autres relations hôte/parasites intracellulaires.

IV.3.2.2 *Marteilia sydneyi* et *Saccostrea glomerata*

L'huître australienne *Saccostrea glomerata* a subi de fortes mortalités depuis les années 70. Ces mortalités survenant en été et en automne ont été associées à la détection du protozoaire *Marteilia sydneyi* (Perkins & Wolf, 1976 ; Roubal *et al.*, 1989 ; Adlard & Ernst, 1995 ; Bezemer *et al.*, 2006). *Marteilia sydneyi* est un protozoaire classé dans le phylum des paramyxa (Berthe *et al.*, 2004). Le mode d'infection et le cycle de vie en dehors de l'hôte sont inconnus.

Les autorités australiennes ont entrepris un programme afin de développer des lignées résistantes d'huîtres vis-à-vis du parasite (Nell *et al.*, 2000 ; Newton *et al.*, 2004). Ce programme a non seulement permis de réduire la mortalité (Nell *et al.*, 2000), mais également d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la résistance à la maladie.

L'hémolymphe de *Saccostrea glomerata* résistantes présente une activité phénoloxydase plus importante que l'hémolymphe des huîtres non-sélectionnées (Butt & Raftos, 2008). De plus, une nouvelle forme d'enzyme peroxydase a été identifiée chez les huîtres résistantes (Bezemer *et al.*, 2006 ; Newton *et al.*, 2004). Plus récemment, une étude a été réalisée visant à comparer la phagocytose de *Marteilia sydneyi* par les hémocytes des huîtres sélectionnées et non-sélectionnées (Kuchel *et al.*, 2010). Après internalisation du parasite, les granules contenus dans les hémocytes fusionnent avec le phagosome, ceci implique un changement de pH chez les hémocytes issus de la population sélectionnée. Il a également été observé une activité de phénoloxydase chez les huîtres résistantes dans les phagosomes après infection *in vitro*. Les données indiquent que les hémocytes d'huître creuse australienne reconnaissent et phagocytent *M. sydneyi*, et que la résistance contre

M. sydneyi peut être associée à une activité phénoloxydase accrue dans les phagolysosomes (Kuchel *et al.*, 2010).

Par ailleurs, une étude transcriptomique chez les huîtres sélectionnées a permis d'identifier des ESTs potentiellement impliquées dans la résistance des huîtres creuses au parasite *Marteilia sydneyi* (Green *et al.*, 2009). Des ESTs ayant un rôle dans l'immunité ont ainsi pu être identifiées : une ficoline de type 4, une lectine de type galactoside, le C1q, une superoxyde dismutase extracellulaire, une peroxiredoxin 6 (Prx 6), une metallothionéine, une small heat shock protein (sHSP), l'IK cytokine et l'IKB. Les huîtres sélectionnées semblent présenter une sur expression de la superoxyde dismutase extracellulaire et de la sHSP tandis que la Prx 6 et l'IK apparaissent sous exprimées. Les huîtres sélectionnées pourraient générer des composés anti-parasitaires de type peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) plus rapidement et à des concentrations supérieures au cours de la flambée oxydative en raison de l'expression différentielle des deux enzymes anti-oxydantes (ec-SOD et Prx 6).

2^{ème} Partie

Acquisition de données moléculaires chez l'huître plate *Ostrea edulis*

Acquisition de données moléculaires chez l'huître plate, *Ostrea edulis*

Les approches de génomique comparative dont l'étude de l'expression de gènes d'intérêt sont de plus en plus utilisées notamment dans l'étude des interactions hôtes-parasites comme les parasites humains ou d'animaux domestiques *Giardia lamblia* (Roxstrom-Lindquist *et al.*, 2005), *Trypanosoma congolense* (Hill *et al.*, 2005), *Plasmodium falciparum* (Bozdech *et al.*, 2003), *Perkinsus marinus*, parasite des huîtres creuses américaine et japonaise, *Crassostrea virginica* et *C. gigas* (Tanguy *et al.*, 2004), *Perkinsus olseni*, parasite de la palourde européenne *Ruditapes decussatus* ou encore *Marteilia sydneyi*, parasite de l'huître australienne (Green *et al.*, 2009).

L'acquisition de données moléculaires a pris un essor considérable ces dernières années grâce à l'apparition de nouvelles technologies. Ces données moléculaires sont nécessaires à une meilleure compréhension du développement d'une maladie. Cependant, actuellement, dans les bases de données publiques, il n'est possible de recenser qu'une soixantaine d'ESTs chez *Ostrea edulis*.

Dans ce contexte, deux approches transcriptomiques ont été réalisées afin d'identifier des ESTs différentiellement exprimées au cours d'infection d'hémocytes *in vitro* par le parasite *Bonamia ostreae*. Ces deux approches ont été complétées par la mise au point d'une PCR en temps réel avec l'identification de gènes de ménage.

Dans une première approche transcriptomique, il a été réalisé deux banques d'ADNc visant à identifier des gènes différentiellement exprimés entre des hémocytes infectés et des hémocytes sains après une infection *in vitro* (Article 1).

Une seconde approche transcriptomique par SSH a été réalisée suite à une infection *in vitro* d'hémocytes de deux populations distinctes d'huîtres par le parasite *Bonamia ostreae*. Dans cette étude, les deux populations sont d'une part des huîtres plates sélectionnées pour leur résistance à la bonamiose et une population dite

«sauvage». Cette approche a permis d'identifier des ESTs différenciellement exprimées pouvant être associées à la résistance ou la sensibilité à la bonamiose (Article 2). La production de banques soustractives a permis d'apporter des éléments nouveaux sur la connaissance du génome de l'huître plate pour lequel pratiquement aucune donnée n'était disponible. Parmi les données obtenues, des ESTs potentiellement impliquées dans les interactions hôte/parasite ont été sélectionnées et leur niveau d'expression évalué en PCR en temps réel.

La technique de PCR en temps réel n'avait pas été utilisée jusqu'alors chez l'huître plate. Il a donc été nécessaire de mettre au point cet outil afin d'étudier les niveaux d'expression des ESTs candidates. L'étude de l'expression relative nécessite l'utilisation d'un ou plusieurs gènes de ménage (housekeeping gene) ou normalisateurs. Ce sont des contrôles internes, qui permettent de normaliser la réaction, l'expression des résultats étant mesurée par rapport aux gènes de ménage. Afin de choisir un gène de ménage adapté, il a été entrepris une étude visant à étudier la stabilité d'expression de plusieurs gènes sélectionnés dans les banques soustractives générées et en accord avec littérature. Aujourd'hui chez les mollusques bivalves seulement deux études rapportent la mise au point de gènes de ménage pour la PCR en temps réel (Araya *et al.*, 2008 ; Siah *et al.*, 2008). Notre étude a été réalisée avec cinq ESTs candidates. Les résultats obtenus, ont permis de sélectionner un gène de ménage (Article 3). L'étude du niveau d'expression des ESTs potentiellement impliquées dans les interactions hôte/parasite a pu alors être entreprise. L'analyse des résultats a permis d'observer des différences de niveau d'expression en fonction des conditions testées.

Dans le présent chapitre, dans un premier temps, il est présenté l'article 1. Cet article cible l'identification d'ESTs différenciellement exprimées au cours d'infections *in vitro*. Cette étude a été complétée par une analyse du niveau d'expression des ARNm d'ESTs ciblés, et la caractérisation complète de deux gènes d'intérêt, un gène codant une galectine (*Oe-Gal*) et un gène codant un IRF (*Oe-IRF*). Cette étude est suivie par la présentation de l'article 2 portant sur l'identification d'ESTs différenciellement exprimées par les hémocytes de deux populations d'huîtres plates en réponse à l'infection *in vitro* par le parasite *Bonamia ostreae*. Le niveau d'expression des ESTs ciblées a été analysé par PCR en temps réel. Deux des ESTs

sélectionnées ont été complètement caractérisées par RACE PCR : un gène codant pour une protéine identifiée comme Fas-ligand (OeFas-ligand) et un gène codant pour un IAP (OeIAP). Enfin, pour terminer cette partie, il est présenté l'article 3. Cet article est consacré à la mise au point de la PCR en temps réel avec l'identification de gènes de ménage qui a permis d'étudier les niveaux d'expression des ESTs précédemment sélectionnées.

Cette partie intègre des résultats complémentaires concernant l'identification et la caractérisation du gène *Oe-MyD88* (Myeloid differentiation primary response gene 88) et *OeC1q* chez *Ostrea edulis*.

I Identification d'ESTs d'intérêt suite à une infection des hémocytes d'huître plate *in vitro* par le parasite *Bonamia ostreae*

Il a été entrepris un travail en biologie moléculaire par la production de banques soustractives afin d'identifier les bases moléculaires des interactions hôte/parasite. Les banques soustractives ont été réalisées pour identifier des ESTs différentiellement exprimées chez les hémocytes d'huîtres plates infectés par le parasite après deux heures de mise en contact. Les banques ont permis d'obtenir 1104 et 1344 clones, parmi lesquels 391 et 480 clones ont montré une expression différentielle entre les deux conditions testées (hémocytes seuls et hémocytes en contact avec les parasites). Le séquençage des clones a permis d'identifier la fonction putative de protéines codées par les ESTs par recherche d'homologies dans les banques de données publiques. Il a été identifié des ESTs impliquées dans le cytosquelette, la chaîne respiratoire, la détoxification, des récepteurs membranaires, et le système immunitaire.

Le travail a été poursuivi par le suivi de l'expression de certaines des ESTs identifiées. Le suivi de l'expression a été réalisé sur trois conditions : des hémocytes infectés par le parasite vivant, des hémocytes mis en contact avec du parasite tué et des hémocytes seuls servant de contrôle à l'étude. Neuf ESTs ont été sélectionnées impliquées dans la détoxification et le stress cellulaire (cytochrome p450, omega glutathione s transferase (OGST), heat shock proteine 90 (HSP 90), superoxide dismutase (SOD)), le cytosquelette (filamine), la communication cellulaire (galectine) et l'immunité (tissus inhibitor of métalloproteinase (TIMP), régulateur de l'interféron (IRF-like), tetraspanine). Après analyse du niveau d'expression de ces ESTs par PCR en temps réel, une surexpression de OGST, SOD, TIMP, galectine, IRF-like et la filamine est observée en présence du parasite vivant.

En complément dans cette étude, il a été caractérisé la séquence complète de deux gènes d'intérêt, les gènes codant la galectine (OeGal) et l'IRF (OeIRF).

Article n°1: Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an *in vitro* infection with *Bonamia ostreae*.

(accepté dans *Developmental & Comparative Immunology*)

Benjamin Morga, Isabelle Arzul*, Nicole Faury, Amélie Segarra, Bruno Chollet and Tristan Renault.

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER);
Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP); La Tremblade, France

*Corresponding author. Mailing address: IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France. Phone: +33 5 46 76 26 10. Fax: +33 5 46 76 26 11. E-mail: iarzul@ifremer.fr

Abstract

Bonamiosis due to the parasite *Bonamia ostreae* is a disease affecting the flat oyster *Ostrea edulis*. *Bonamia ostreae* is a protozoan, affiliated to the order of haplosporidia and to the cercozoan phylum. This parasite is mainly intracellular, infecting haemocytes, cells notably involved in oyster defence mechanisms.

Suppression subtractive hybridisation (SSH) was carried out in order to identify oyster genes differentially expressed during an infection of haemocytes with *B. ostreae*. Forward and reverse banks allowed obtaining 1104 and 1344 clones respectively, among which 391 and 480 clones showed a differential expression between both tested conditions (haemocytes alone versus haemocytes in contact with parasites). ESTs of interest including genes involved in cytoskeleton, respiratory chain, detoxification membrane receptors, and immune system were identified. The open reading frames of two selected genes (galectin and IRF-like) were completely sequenced and characterized. Real time PCR assays were developed to study the relative expression of candidate ESTs during an *in vitro* infection of haemocytes by live and dead parasites.

Haemocyte infection with *Bonamia ostreae* induced an increased expression of omega glutathione s transferase (OGST), superoxide dismutase (SOD), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP), galectin, interferon regulatory factor (IRF-like) and filamin genes.

Key words: *Bonamia ostreae*, Protozoan, *Ostrea edulis*, Flat oyster, Haemocytes, Gene expression, Suppression subtractive hybridisation.

1. Introduction

The parasite *Bonamia ostreae* was firstly described in France in association with mass mortality of flat oysters occurring in the late 1970's along the French coast (Pichot et al. 1979 and Comps et al. 1980). This intracellular protozoan has contributed to drastically decrease the French production of flat oysters which is now estimated at 1

900t per year (data available in the fishstat database, <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>). *Bonamia ostreae* is affiliated to the order of haplosporidia and to the phylum of cercozoan (Cavalier-Smith and Chao, 2003). The parasite is most often observed inside the haemocytes (Pichot et al. 1979; Comps et al. 1980), but it can also be observed extracellularly in the digestive gland and in the gills (Montes et al. 1994). The multiplication of the parasite is associated with haemocyte disruption. Haemocytic infiltration is observed in different tissues including digestive gland, mantle and gills (Balouet et al. 1983 ; Cochenne-Laureau et al. 2003).

Haemocytes, the circulating cells present in haemolymph, play a key role in the immune response of molluscs (Fisher, 1986). Bivalves lack specific immune system and immune memory. Their immune response relies on innate cellular and humoral mechanisms both operating in coordination to recognise and eliminate pathogens. Phagocytosis is the main cellular immune response against pathogens in molluscs (Cheng, 1981 ; Feng, 1988). Phagocytosis includes three main steps: recognition/adhesion, engulfment/internalisation and degradation (Cheng, 1981 ; Feng, 1988). However, after internalisation, various pathogens are able to survive in the phagocytes escaping post-phagocytosis mechanisms (Alavi et al. 2009). Previous studies have shown that *B. ostreae* is internalised after two hours of contact. Chagot et al. (1992) and Mourton et al. (1992) have demonstrated that the parasite *B. ostreae* was internalised after 30 min of contact with haemocytes and was not degraded after phagocytosis. Few studies have investigated the immune response of bivalve molluscs against parasites (Tanguy et al. 2004; Kang et al. 2006 ; Green et al. 2009 and Prado-alvarez et al. 2009). Such studies are usually based on the suppression subtractive hybridisation (SSH) technique. This approach allows the identification of genes differentially expressed between two conditions.

Studies carried out on the interactions between haemocytes and parasites have been performed by cellular approaches (Mourton et al. 1992, Xue and Renault, 2001, Cochenne-Laureau et al. 2003 and Morga et al. 2009). Molecular responses of *Ostrea edulis* oysters against the parasite *Bonamia ostreae* have never been investigated. Moreover, few sequence data on *Ostrea edulis* genome are available in public databases (Genbank). The only sequences available have been used to determine the phylogenetic position of *Ostrea edulis* (Lopez-Flores et al. 2004).

In this context, the aim of the present study was the identification of flat oyster genes differentially expressed by haemocytes infected by the parasite *B. ostreae* compared to haemocytes alone using SSH approach. Among the obtained libraries, nine ESTs were selected according to their putative biological function: (1) detoxification and stress protein (cytochrome p450, OGST, HSP 90, SOD), (2) cell communication, membrane receptor and immune system (TIMP, galectin, IRF-like, tetraspanin) and (3) cytoskeleton structure (filamin).

In addition, RT PCR assays were developed in order to estimate expression level of ESTs of interest during an *in vitro* infection of haemocytes with live and dead parasites. Dead parasites allowed us to test the specificity of the haemocyte response against live parasite. Finally, the open reading frames of two selected genes related to immunity (galectin and IRF-like) were completely sequenced and characterized.

2. Material and methods

2.1 Biological material

2.1.1 Oysters

Two-year-old flat oysters *Ostrea edulis* (n=90) were collected from Quiberon Bay (Southern Brittany, France), a bonamiosis endemic zone and were acclimatized in the quarantine facilities of IFREMER laboratory in La Tremblade (Charente-maritime, France) over 30 days. Flat oysters were maintained in 120 l raceways supplied with a constant flow of seawater enriched with phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracialis* and *Tetraselmis succica*).

2.1.2 Haemolymph collection

Haemolymph was withdrawn from the adductor muscle using a 1mL syringe equipped with a needle (0.40x90mm). Haemolymph samples were filtered on a 75 µm mesh to eliminate debris and maintained on ice to prevent cell aggregation. Haemolymph samples were pooled. Haemocyte counts were performed using a

Malassez cell and cell concentration was adjusted at $2 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹ with seawater filtered at 0.22 μ m (FSW).

2.1.3 Parasites

Bonamia ostreae was purified according to a previously published protocol (Mialhe et al. 1988). Briefly, heavily infected oysters were selected by examination of heart tissue imprints using light microscopy. After homogenization of all the organs except the adductor muscle, the parasites were concentrated by differential centrifugation on sucrose gradients and then purified by isopycnic centrifugation on a Percoll gradient. Finally, the purified parasites were suspended in FSW. *Bonamia ostreae* cells were then counted using a Malassez-cell and parasite concentration was adjusted at $10 \cdot 10^7$ cells mL⁻¹ with FSW.

For inactivation, parasites were heated at 100°C for 15 min. The efficiency of the inactivation treatment was controlled in flow cytometry using propidium iodide (Arzul et al. 2009).

2.2 *In vitro* infection protocol

A first experiment including haemocytes alone and haemocytes infected with live parasites was performed in order to construct forward and reverse SSH libraries.

The expression level of some genes identified through SSH was then evaluated during a second *in vitro* experiment including two conditions i.e. haemocytes in contact with live parasites and haemocytes in contact with dead parasites and a control consisting of haemocytes alone.

Whatever was the experiment, haemocytes were maintained in contact with purified parasites (live or dead) during 2 hours. For that purpose, 5 ml of haemocyte suspension were introduced in plastic flasks and incubated at 15°C for two hours until the formation of a cell layer. Supernatant was then withdrawn, preserved after 0.22 μ m filtration and replaced by 500 μ l of parasite suspension. After 2 hours, supernatant previously filtered at 0.22 μ m to eliminate bacteria, was introduced again in flasks. After 12-hour incubation, cells were rinsed twice with phosphate buffer saline (PBS

1X) and were processed for RNA extraction using TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

2.3 Suppression subtractive hybridisation (SSH)

Two micrograms of mRNA (1 µg from the haemocytes exposed to the parasite and 1 µg from the haemocytes alone) were used as templates for the SSH following the PCR-select cDNA subtraction kit procedure (Clontech) (Diatchenko et al., 1996). Forward subtraction was carried out using the haemocytes exposed to the parasite as the tester and the haemocytes alone as the driver. The opposite was performed for reverse subtraction. PCR products were cloned using TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). White colonies were screened by macro-arrays. Inserts were PCR amplified using TOPO F and R primers (Table 1) and one microliter of PCR product was spotted in duplicate onto nylon membrane (Roche). cDNA was digoxigenin labelled and used as probe in hybridisation experiments using the DIG-labelling and detection kit according to the manufacturer's instructions (Roche diagnostic).

2.4 Sequencing and sequence analysis

Clones showing a differential digoxigenin labelling intensity between infected haemocytes and haemocytes alone were selected and amplified using TempliPhi™ DNA Sequencing Template Amplification Kit (Amersham's). PCR products isolated from individual clones were sequenced in one way with TOPO F with the sequencing kit ABI BigDye® terminator version 3.1 using an ABI PRISM® 3130 XL-Avant Genetic Analyzer, a 36 cm capillary array and POP 7 polymer. Chromatograms were analyzed with Chromas 231 software. Sequences were then analysed with BlastX algorithm available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). EST sequences were then submitted to dbEST and GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Only E values less than 10⁻⁴ were considered significant.

2. 5 Identification and characterization of immune-related genes

In order to obtain the complete open reading frame (ORF) of galectine, OeGal and Interferon regulatory factor like, OeIRF, RACE PCR reactions were carried out using SMART RACE cDNA Amplification Kit from Clontech according to the manufacturer's instructions. 5' and 3' primers were designed using primer 3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (3'Galrace GACATCGACTGCAGCCACTAAACAG, 5'Galrace TATGGGCTGTGTCTCTCTCTGCTC and 3'IRFrace TGGGTCCAGACACGGGTCAATAC, 5'IRFrace CACCTTGCTCTCACCCAGGTTT). After ligation and cloning in TOPO Vector System (Invitrogen) and transformation in Top 10 competent bacteria (Invitrogen), several clones were sequenced using the same protocol as described before. Open reading frames were identified using ORF finder in NCBI. Complete sequences were deposited in GenBank and assigned under the accession numbers GU320697 (OeGal) and GU320698 (OeIRF-like). The isoelectric point and molecular mass were calculated in http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html.

2.6 Phylogenic analysis of Galectin and Interferon regulatory factor like (IRF-like)

The sequence of the complete ORF of OeGal was aligned with homologous genes available in GenBank database (*Homo sapiens sapiens* NM_006149.3, *Bos taurus* NM_001034768.1, *Mus musculus* NM_010706.1, *Oryctolagus cuniculus* NM_001082713.1, *Salmo salar* NM_001146582.1, *Xenopus laevis* NM_001085572.1, *Danio rerio* AY421706.1, *Strongylocentrus purpuratus* XM_001191059.1, *Pinctada fucata* FJ267519.1, *Venerupis philipinarum* EU437401.1, *Biomphalaria gabralata* EF687664.1 and *Haliotis discus hannai* EF392832.1)

The sequence of the complete ORF of OeIRF-like was aligned with IRF-1, IRF-2, IRF-3 and IRF 7 genes from GenBank database (IRF-1: *Homo sapiens sapiens* ABH05670.1, *Mus musculus* P15314.1, *Oncorhynchus mykiss* NP001117765.1, *Salmo salar* AC168339.1, *Sparus aurata* AAY68282.1, *Scophtalmus maximus* AAY68279.1, *Gadus marhua* ACJ06730.1, *Carassius auratus* ABM55678.1, *Danio rerio* AY421706.1, *Hydra magnipapillata* XP002168717.1; IRF-2 : *Homo sapiens sapiens* NP002190.2, *Mus musculus* P23906.1, *Oncorhynchus mykiss* AAK53987.1, *Salmo salar* ACI33066.1,

Chana argus ABK63484.1, *Siniperca chuatsi* ABJ09546.1; IRF-3 : *Homo sapiens sapiens* AAH09395.1, *Mus musculus* AAH50882.1, *Salmo salar* ACN11005.1, *Danio rerio* NP001137376.1 and IRF-7: *Homo sapiens sapiens* AA136556.1, *Mus musculus* NP058546.1, *Salmo salar* NP001130020.1, *Carassius auratus* AAO18646.1).

Alignments were performed using Clustal W (Thompson et al. 1997) including in MEGA 4 (Tamura et al. 2007). A phylogenetic tree based on amino acid sequences was built using the Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987) algorithm with the MEGA 4 software program. Statistical confidence on the inferred phylogenetic relationships was assessed by bootstrap of 1000 replicates.

2.7 Expression analysis of the selected ESTs by quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed in TRIZOL, RNA was separated from DNA and proteins using phenol chloroform. Total RNAs were precipitated using isopropanol. The RNA pellet was washed with 75% ethanol solution and finally eluted in 22 µl of DEPC water. The RNA concentration was determined using a spectrophotometer at 260 nm and RNA quality was assessed on a 1% agarose gel. Total RNAs were treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) to remove remaining genomic DNA.

First strand cDNA was synthesized using the oligo(dT) anchor primer (5'-GAC CACGCGTATCGATGTCGACT(16)V-3') and Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) reverse transcriptase SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

For each of the selected genes, forward and reverse primers were designed using primer 3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Table 1). Real-time quantitative PCR reactions were duplicated and performed in a total volume of 25 µL using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Stratagene) in 96-microwell plates. Each well (25 µL) contained 5 µL of cDNA dilution (1/30), 12.5 µL of Brilliant® SYBR® Green II PCR Master Mix (Stratagene), 2.5 µL of each diluted primer (3µM) and 2.5 µL of distilled water. Thermal cycling conditions were: 1 cycle of activation of Hot start Taq polymerase at 95 °C for 10 min; 40 cycles of amplification at 95°C for 10 s, 60°C for 30 s; and melting temperature curve analysis at 95°C to

60°C by 0.5°C decrease of the temperature every 10 s. In all cases, negative controls (without cDNA) were included to rule out DNA contamination.

For each candidate gene, melting curve and gel picture were analysed in order to verify the specificity of the amplified products and that at a single PCR product was amplified. PCR efficacy (E) was calculated for each primer pair by determining the slopes of standard curves. These curves were generated using a serial dilutions analysis of plasmid containing the insert of interest. Amplification efficacies were calculated according to the following equation $E=10^{(1-slope)}$ (Pfall, 2001).

The expression of the candidate genes was normalized using the elongation factor 1 alpha (EU651798) as housekeeping gene (Morga et al. unpublished data) and haemocytes alone were used as calibrator. Primers are shown in Table 1. Fold units were calculated using the method described by (Pfall, 2001).

3. Results

3.1 ESTs sequencing identification

The SSH technique was used to identify transcripts differentially expressed between haemocytes in contact with parasites and haemocytes alone. 864 clones were sequenced and 809 sequences (93% of the sequenced clones) were obtained and analysed (Table 2). These sequences ranging from approximately 175 to 600 bp in length were analysed to evaluate redundancy by multiple alignments using the Lasergene software. Finally, 330 unique ESTs were identified including 56 contigs and 274 singletons. Among these, 224 ESTs showed similarities with genes available in databases with an E value < 10⁻⁴ and clustered in 8 main categories according to their putative biological function (Fig. 1): (1) detoxification, (2) cell communication, membrane receptor, immune system, (3) ribosomal protein, (4) cytoskeleton structure, (5) respiratory chain, (6) cell cycle, DNA repair, protein regulation and transcription, (7) cell metabolism and (8) hypothetical protein.

3.2 Identification and characterization of *Ostrea edulis* immune-related genes

3.2.1 Galectin (*Oegal*)

Ostrea edulis cDNA galectin (*Oegal*) shows a 1394 nucleotide (nt) sequence. The complete sequence was deposited in GenBank and assigned under the accession number GU320697. The sequence contains a short 5'-untranslated region (1-95 nt) followed by an ORF of 1103 nt (335 codons: 96-1103 nt) and finished by a 3'-untranslated region (1104-1394 nt) with a polyadenylation signal (AATAAA) starting 17bp upstream from the polyA tail (Fig. 2). The complete ORF has a putative molecular mass at 36 947.07 Da and a predicted isoelectric point at 8.93. The analysis of the ORF revealed the presence of two homologous carbohydrate recognition domains (CRD), characteristic of tandem-repeat type galect. These CRDs, CRD1 and CRD2, consist of 121 and 134 amino acids (Fig. 2) respectively.

The analysis of the CRD1 and CRD2 allowed the identification of 8 highly conserved amino acid (aa) within each CRD. These aa are known to be involved in sugar galactosyl-binding activity in invertebrate tandem-repeat type galectins (Pace et al. 2002 and Huang et al. 2007) (Fig. 2).

Phylogenic tree analysis of vertebrate and invertebrate dual-CRD or tandem-repeat type galectins grouped *Oegal* within the metazoan invertebrate clade and showed closest affinity to other molluscs, including pearl oyster *Pinctada fucata*, clam *Venerupis philippinarum*, abalone *Haliotis discus hannai* and snail *Biomphalaria gabralata* (Fig. 3).

3.2.2 Interferon regulatory factor like (*OeIRF*)

Ostrea edulis cDNA interferon regulatory factor like (*OeIRF*) is composed of 1738 nucleotides (nt). The complete sequence was deposited in GenBank and assigned under the accession number GU320698. The sequence contains a short 5'-untranslated region (1-95 nt) followed by an ORF of 1076 nt (326 codons: 96-1076 nt) and finished by a 3'-untranslated region (1077-1738 nt) with a polyadenylation signal (AATAAA) starting 13 bp upstream from the polyA tail (Fig. 4). The complete ORF shows a molecular mass at 37208.09 Da and predicted isoelectric point at 5.32.

The analysis of the ORF revealed the presence of an IRF superfamily domain, including five conserved tryptophans in the DNA binding region (Fig. 4).

The full-length flat oyster interferon regulatory factor like (OeIRF) sequence showed 39,3% and 37,7% identities with human (IRF-1) and IRF-2 respectively and 48,9% and 34,9% identities with trout (IRF-1) and IRF-2 respectively (Fig. 5 and 6).

Phylogenic tree analysis showed that OeIRF is closer to IRF1 and 2 than to other IRFs (Fig. 7).

3.3 ESTs expression patterns in haemocytes infected with live or dead *Bonamia ostreae*

Relative expression of the selected ESTs (Table 3) was measured in haemocytes infected with live parasites and in haemocytes infected with dead parasites. Expression levels in both conditions were normalized using haemocyte alone.

Live parasites induced a significant increase of the expression levels of OGST (1.8), SOD (3.4), TIMP (1.9), OeGal (2.8), OeIRF (4), cytochrome oxydase III (1.7) and filamin (51) (Fig. 8). Expression levels of HSP 90 and cytochrome p450 were not significantly affected by the presence of the live parasites while tetraspanin (0.5) appeared down regulated in the same condition.

Presence of dead parasites induced a significant increase of the expression of parasite cytochrome p450 (2.1) and, OeIRF (1.7) and a down regulation of OeGal (0.3) and OGST (0.4) (Fig. 8).

4. Discussion

Diseases are one of the major risks affecting the mollusc production worldwide and the immune responses of bivalve hosts against pathogens are often scarcely understood. However, some studies have been carried out to better understand host/pathogen interactions at a molecular level in different bivalve species including *Crassostrea gigas* (Gueguen et al. 2003), *Crassostrea virginica* (Tanguy et al. 2004), *Saccostrea glomerata* (Green et al. 2009), *Ruditapes phillipinarum* (Kang et al. 2006) and *Ruditapes decussatus* (Prado-alvarez et al. 2009).

The suppression subtractive hybridization method (SSH) is a PCR-based technique that allows the identification of genes differentially expressed in response to biotic or abiotic stimuli. This method is currently used to identify genes involved in different molecular mechanisms in a large variety of species including marine invertebrates (Brown et al. 2006 ; Gestal et al. 2007 ; Meistertzheim et al. 2007 and Wang et al. 2008).

The present work constitutes the first study on *Ostrea edulis* responses to the parasite *Bonamia ostreae* based on a molecular approach, i.e. SSH. Application of this method allowed the identification of 864 ESTs differentially expressed between haemocytes alone and haemocytes infected with *B. ostreae*. Among the ESTs presenting a significant homology in Genbank, nine ESTs were selected according to their putative biological function.

The expression pattern of these ESTs was measured and compared between haemocytes in contact with live and dead parasites in order to identify the modulation specifically induced by an *in vitro* infection with *B. ostreae*. Real-time PCR analyses confirmed the differential expression of seven out of the nine tested ESTs (more than one fold difference) between the two tested conditions and the normalisator of this experiment, i.e haemocytes alone.

In our study, the putative tetraspanin gene appeared down regulated in haemocytes in contact with live parasites. On the contrary, tetraspanin was found up-regulated in response to the parasite *Perkinsus marinus* 45 days after inoculation in *C. virginica* and *C. gigas* (Tanguy et al. 2004). Members of the tetraspanin family are involved in various biological processes such as cell adhesion, migration, cell fusion, co-stimulation, signal transduction, immune system and differentiation (Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2005 and Levy and Shoham, 2005); however, their precise function remains unknown.

The putative TIMP gene was found significantly more expressed in haemocytes exposed to live parasites in comparison with haemocytes exposed to killed parasites. Protease inhibitors such as TIMP were found over expressed in the context of infection with *Schistosoma mansoni* and *Vibrio splendidus* (Labreuche et al. 2006 and Guillou et al. 2007). *B. ostreae* like other mollusc parasites may produce proteases (Faisal et al. 1999 and Ordás et al. 2001), which may contribute to modulate the immune response of the host (Hervio et al. 1991).

The over expression of O-GST and SOD genes in presence of live parasites might be related to an increase of cytotoxic components generated during an immune response as shown by (Guillou et al. 2007) in *Biomphalaria gabralata*. SOD is known to be involved in the oxidative stress response. Glutathione S-transferases play important role in the detoxification of endogenous and exogenous toxic compounds during an immune response (Brophy and Pritchard, 1992 and Brophy and Pritchard, 1994). A previous study showed a significant decrease of reactive oxygen species (ROS) production in *O. edulis* haemocytes after an *in vitro* infection of *O. edulis* haemocytes with live parasites versus haemocytes alone (Morga et al. 2009). These results suggest that *B. ostreae* has inhibitory effects on ROS production through the activation of genes involved in detoxification.

The putative filamin EST, a gene related to the cytoskeleton structure, was over expressed in haemocytes in contact with live parasites compared to haemocytes in contact with dead parasites. The cytoskeleton plays a central role in many cell functions such as the maintenance of cell shape, cell division, adhesion, motility, signal transduction and protein sorting. Filamins are a family of high molecular mass cytoskeletal proteins that crosslink cortical actin into a dynamic three-dimensional structure and interact with a large number of cellular proteins of great functional diversity, suggesting that they are unusually versatile signalling scaffolds (Feng and Walsh, 2004). The filamin over expression observed in haemocytes in contact with live parasites suggests an increase of cytoskeleton polymerisation which may result in an increased parasite internalisation. These results support the hypothesis expressed by Chagot et al., (1992). These authors demonstrated that *B. ostreae* was not engulfed when haemocytes were treated with cytochalasin B prior to parasite contact suggesting an active participation of host cells in the internalisation of the parasite. Similar results were reported by Gonzales et al. (2009) for *Toxoplasma gondii* tachyzoites and *Plasmodium berghei* sporozoites.

For the first time, we detected and fully characterized a member of the IRF family in a mollusc species. The IRF family includes nine members which regulate IFN- α/β production (De Maeyer and De Maeyer-Guignard, 1988). IRFs are generally associated with the immune response against viral infectious (Collet et al. 2003). However, they have functionally diverse roles in the regulation of the immune system particularly through Toll-like receptors and other pattern-recognition receptors

(Honda and Taniguchi, 2006). In the present study, the putative OeIRF was over expressed in haemocytes exposed to live parasites. This over expression of OeIRF could translate a response of the flat oyster against the infection with parasite *B. ostreae*.

A member of the galectin family was also identified and fully characterized. Lectins act as pattern recognition receptors (PRRs) (Medzhitov and Janeway, 2002), a group of diverse, soluble and membrane-associated molecules such as Toll like receptors (TLRs), nucleotide-binding oligodimerization domains (NODs) and NK cell receptors. Galectins are able to bind glycans present on the surface of microorganisms and favour the entrance of the pathogens inside the cell. A wide range of galectin types was described in mammals (Cooper 2002). The galectin presently identified in *O. edulis* (OeGal) exhibits two CRDs joined by a linker peptide and appears closed to galectin 4 of mammals. A similar galectin was described in *Biomphalaria gabralata* (Yoshino et al. 2008) and *Pinctada fucata*. Recently, a four repeat CDRs galectin was identified in *C. virginica* (Tasumi and Vasta, 2007). These authors investigated the role of the galectin during the interactions between oyster haemocytes and the intracellular parasite *P. marinus*. *C. virginica* galectin bound bacteria, phytoplankton components and preferentially *Perkinsus spp.* trophozoites. These results suggested the direct role of the galectin in the recognition and opsonisation of potential microbial pathogens and algal food. Similar results were obtained for the tandem repeat CRDs in *B. gabralata*, the intermediate host of *S. mansoni* (Yoshino et al. 2008). In our study, OeGal expression appeared up regulated in presence of live parasites and down regulated with dead parasites. OeGal seems thus involved in the recognition of the parasite *B. ostreae*. In a previous study, phagocytosis of *B. ostreae* was not affected by the prior incubation of haemocytes with sugar (mannose, glucose, fucose, N-acethyl glucosamine and galactosamine) while a similar parasite treatment induced a significant decrease of *in vitro* infection (Chagot 1989). These results suggested that haemocyte surface lectins do not play a key role in the binding of the parasite while parasite lectins are involved as receptor or ligand during the infection process. Ours results differ from the conclusion of this previous study and suggest an involvement of the haemocyte lectins in the infection with *B. ostreae*.

The present study is the first transcriptomic investigation of interactions between haemocytes from *O. edulis* and the parasite *B. ostreae*. This work has generated new data concerning the host genome and contributes to a better understanding of the

relationships between host and parasite. The analysis of expression level by real time PCR has brought new insight concerning the molecular mechanisms expressed by the haemocyte in response to the parasite internalisation. OeGal seems to be involved in the recognition of *B. ostreae* by the haemocytes. In addition the parasite seems to interact with the expression of host genes related to detoxification and immune response including SOD, OGST, TIMP and IRF-like. However, these results require further investigations.

Acknowledgement

The authors are very grateful to anonymous reviewers for revising the manuscript. The Région of Poitou Charentes supported in part this research. The authors thank Raphael Brizard for technical assistance for the maintenance of oysters in IFREMER La Tremblade quarantine facilities.

References

- Alavi M.R., Fernandez-Robledo J.A., Vasta G.R. 2009. *In vitro* intracellular survival of *Perkinsus marinus* trophozoites upon phagocytosis by oyster (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariankensis*) haemocytes. *J. Parasitol.* 95, 900-907.
- Arzul I., Gagnaire B., Bond C., Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M., Renault T., 2009. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis Aquat Org.* 85, 67-75.
- Balouet G., Poder M., Cahour A., 1983. Haemocytic parasitosis : morphology and pathology of lesions in the french flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture.* 34, 1-14.
- Boucheix C and Rubinstein E., 2001 Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci.* 58, 1189-1205.
- Brophy P.M. and Pritchard D.I., 1992. Metabolism of lipid peroxidation products by the gastrointestinal nematodes *Necator americanus*, *Ancylostoma ceylanicum* and *Heligmosomoides polygyrus*. *Int J Parasitol.* 22, 1009-1012.
- Brophy P.M. and Pritchard D.I., 1994. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno and chemotherapy. *Exp Parasitol.* 79, 89-96.
- Brown M., Davies I.M., Moffat C.F., Craft J.A., 2006. Application of SSH and a macroarray to investigate altered gene expression in *Mytilus edulis* in response to exposure to benzo(a)pyrene. *Mar Environ Res.* 62, 128-135.
- Cavalier-Smith T. and Chao E.E., 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist.* 143, 341-358.
- Chagot D., 1989. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Acestospora). Thèse EPHE Sciences de la vie et de la terre, Université de Montpellier. 151.
- Chagot D., Boulo V., Hervio D., Mialhe E., Bachere E., Mourton C., Grizel H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascestospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *J. Invertebr. Pathol.* 5, 241-249.
- Cheng T.C., 1981. Bivalves. In: N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley, Editors, *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press. London. 233-299.
- Cochennec-Laureau N., Auffret M., Renault T., Langlade A., 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 23-30.
- Collet B., Hovens G.C., Mazzone D., Hirono I., Aoki T., Secombes C.J., 2003. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2). *Dev Comp Immunol.* 27, 111-126.
- Comps M., Tige G., Grizel H., 1980. Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* (L.). *C. R. Acad Science Paris.* 290, 383-385.
- Cooper D.N.W., 2002. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta.* 1572, 209-231.
- De Maeyer E. and De Maeyer-Guignard J., 1988. Interferons and other regulatory cytokines. John Wiley and sons ed, New York.
- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Syerdlov E.D., Siebert P.D., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12, 6025-6030.
- Faisal M., Schafhauser D.Y., Garreis K.A., Elsayed E., La Peyre J.F., 1999. Isolation and characterization of *Perkinsus marinus* proteases using bacitracin-sepharose affinity chromatography. *Comp Biochem Physiol.* 123, 417-426.
- Feng, S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fisheries Society. Special Publication.* 18, 153-168.
- Feng Y. and Walsh C.A., 2004. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol.* 11, 1034-1038.
- Fisher S.W., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In: M. Brehélin, Editor, *Immunity in invertebrates.* 25-35.

- Gestal C., Costa M., Figueras A., Novoa B., 2007. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: identification of new antimicrobial peptides. *Gene*. 406, 134-143.
- Gueguen Y., Cadoret J-P., Flament D., Barreau-Roumiguière C., Girardot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère E., Escoubas J-M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from haemocytes of the bacteria-challenged oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*. 303, 139-145.
- Guillou F., Mitta G., Galinier R., Coustau C., 2007. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol*. 31, 657-671.
- Gonzalez V., Combe A., David V., Malmquist N.A., Delorme V., Leroy C., Blazquez S., Ménard R., Tardieux I., 2009. Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerisation in the host cell. *Cell Host & Microbe*. 5, 259-272.
- Green T.J., Tom J., Dixon T.J., Devic E., Adlard R.D. Barnes A.C., 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol*. 26, 799-810.
- Hemler M.E., 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6, 801-811.
- Hervio D., Chagot D., Godin P., Grizel H., Mialhe E., 1991. Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Asctospora), an intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Dis Aquat Org*. 11, 67-70.
- Honda K. and Taniguchi T., 2006. IRFs: master regulators of signalling by toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*. 6, 644-658.
- Huang X., Tsuji N., Miyoshi T., Nakamura-Tsuruta S., Hirabayashi J., Fujisaki K., 2007. Molecular characterization and oligosaccharide-binding properties of a galectin from the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Glycobiology*. 27, 313-323.
- Kang Y.S., Kim Y.M., Park K.I., Kim Cho S., Choi K.S., Cho M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in haemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev Comp Immunol*. 30, 1119-1131.
- Labreuche Y., Lambert C., Soudant P., Boulo V., Huvet A., Nicolas J.L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect*. 8, 2715-2724.
- Levy S. and Shoham T., 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature Rev Immunol*, 5, 136-148.
- Lopez-Flores I., de la Herran R., Garrido-Ramos M.A., Boudry P., Ruiz-Rejon C., Ruiz-Rejon M., 2004. The molecular phylogeny of oysters based on a satellite DNA related to transposons. *Gene*. 339, 181-188.
- Medzhitov R. and Janeway C.A.Jr., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 296, 298-300.
- Meistertzheim A.L., Tanguy A., Moraga D., Thebault M.T., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS*. 274, 6392-6402.
- Mialhe E., Bachere E., Chagot D., Grizel H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture*. 71, 293-299.
- Montes J., Anadon R., Azevedo C., 1994. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol*. 63, 1-6.
- Morga B., Arzul I., Chollet B., Renault T., 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol*. 26, 836-842.
- Mourton C., Boulo V., Chagot D., Hervio D., Bachere E., Mialhe E., Grizel H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): *in vitro* system establishment. *J. Invertebr Pathol*. 59, 235-240.
- Ordás M.C., Novoa B., Faisal M., McLaughlin S., Figueras A., 2001. Proteolytic activity of cultured *Pseudoperkinsus tapetis* extracellular products. *Comp Biochem and Physiol B Bioche Mol Biol*. 130, 199-206.

- Pace K.E., Lebestky T., Hummel T., Arnoux P., Kwan K., Baum L.G., 2002. Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin-expression in developing immune, neural, and muscle tissues. *J Biol Chem.* 277, 13091-13098.
- Pfall MW., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29, 2002-2007.
- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., Rabouin M.A., 1979. Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 43, 131-140.
- Prado-Alvarez M., Gestal C., Novoa B., Figueras A., 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 72-83.
- Saitou N. and Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4, 406-425.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24, 1596-1599.
- Tanguy A., Guo X., Ford S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Gene.* 338, 121-131.
- Tasumi S. and Vasta GR., 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *J Immunol.* 179, 3086-3098.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Wang K.J., Ren H.L., Xu D.D., Cai L., Yang M., 2008. Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Dev Comp Immunol.* 32, 1326-1347.
- Xue Q.G., Renault T., Chilmonczyk S., 2001. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 557-567.
- Yoshino T.P., Dinguirard N., Kunert J., Hokke C.H., 2008. Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Gene.* 411, 46-58.

Figure captions

Figure 1 Functional classification of the sequences identified in both libraries (ESTs). Genes were clustered into 8 categories according to their putative biological function.

Figure 2 Complete ORF nucleotide and deduced amino acid sequences of the flat oyster OeGal. ORF contains two CRD, CRD1 (galect) (96-515 nt) in red, CRD2 (galect) (675-1089 nt) in yellow. Amino acid involved in sugar galactosyl-binding activity are boxed.

Figure 3 Neighbour-joining tree showing phylogenetic analysis of galectin amino acid sequences from various species. The tree is based on 1000 bootstrap replications. The scale for branch length (0.1 substitutions/site) is shown below the tree.

Figure 4 Complete ORF nucleotide and deduced amino acid sequences of the flat oyster OeIRF. ORF contains a DNA binding domain including five conserved tryptophans (underlined in yellow) and polyadenylation signal (AATAAA) (underlined in grey).

Figure 5 Protein sequence alignment of IRF-1: *Ostrea edulis* (OeIRF), IRF-1 *Homo sapiens* and *Oncorhyncus mykiss* (GenBank™ accession nos. ABH05670.1 and NP001117765.1 respectively). First alignment series shows the aa identities (points) of the OeIRF with two IRF-1 protein.

Figure 6 Protein sequence alignment of IRF-2: *Ostrea edulis* (OeIRF), IRF-2 *Homo sapiens* and *Oncorhyncus mykiss* (GenBank™ accession nos. NP002190.2 and AAK53987.1 respectively). First alignment series shows the aa identities (points) of the OeIRF with two IRF-2 protein.

Figure 7 Neighbour-joining tree showing phylogenetic analysis of IRF 1,2,3 and 7 amino acid sequences from various species. The tree is based on 1000 bootstrap

replications. The scale for branch length (0.1 substitutions/site) is shown below the tree.

Figure 8 Relative expression by quantitative PCR of selected transcripts from SSH (Hsp 90, cytochrome p450, o-GST, SOD, TIMP, galectin, IRF, tetraspanin and fimanin) libraries. Expression levels were normalized to EF1- α and presented as relative expression to controls (mean \pm SD, n = 2). * indicates significant differences of gene expression compared to controls.

Fig.1

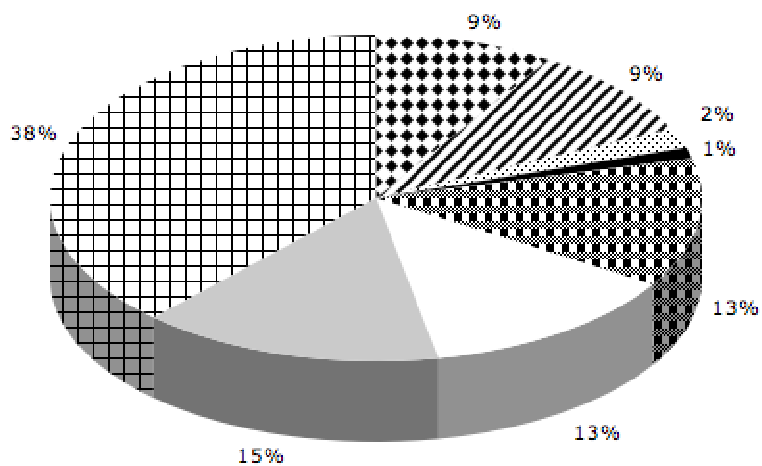
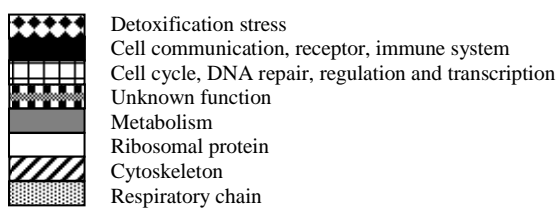
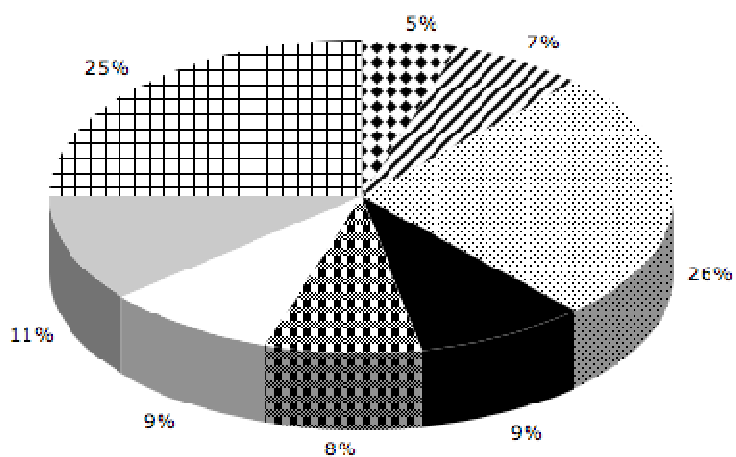
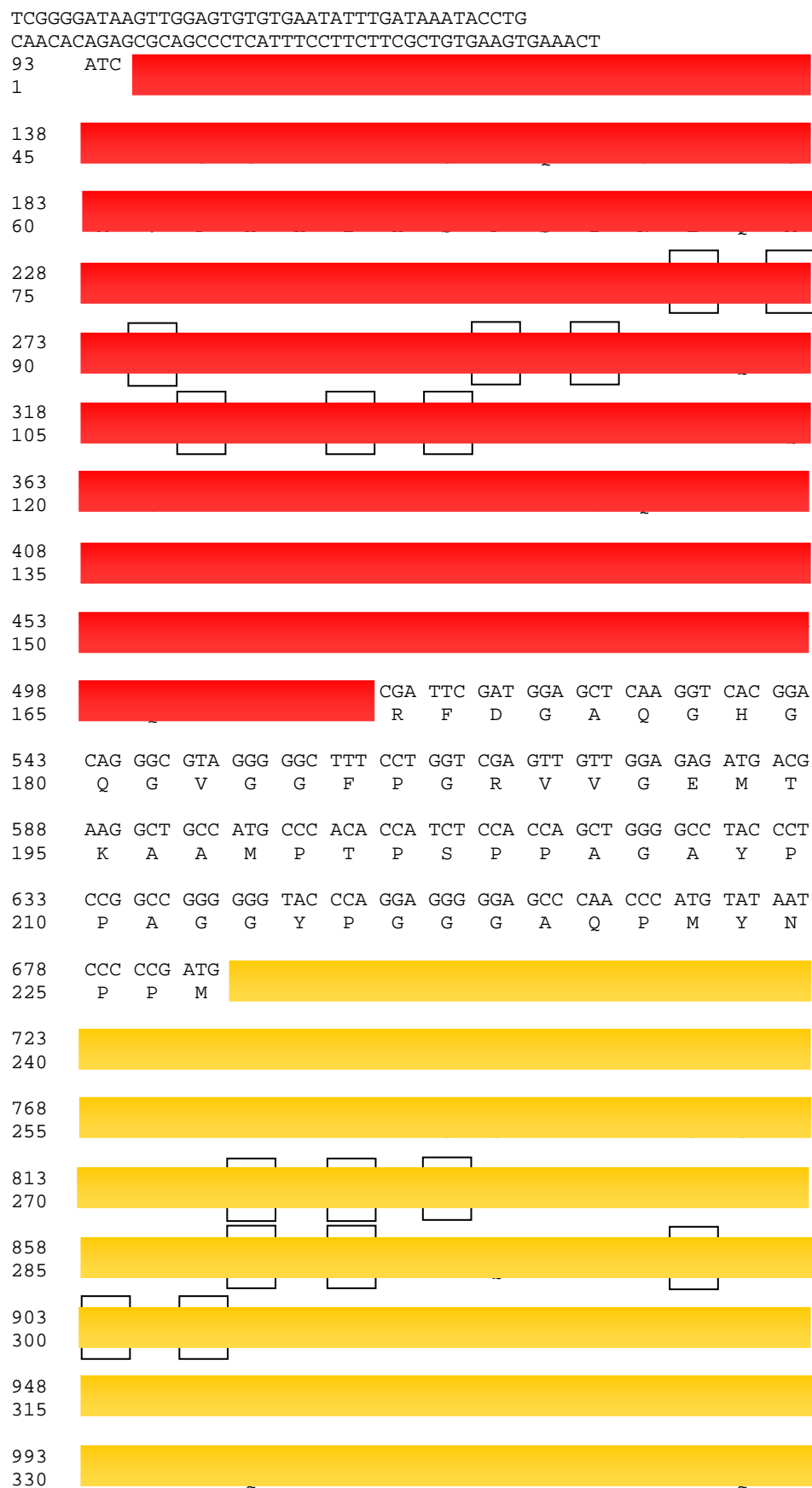


Fig.2



1038
 345

1083 CGA TTC CAA TAA ATT TAT ATG TCA TTA TCA TCA TAC
 360 R F Q *

1128 ATTCATACAAGAAACAAAATGCAGAGCAAATAATTGGTTAAAGTA
 1173 TTGTACATTTGTATTTTTGTGAAACAAATGATTATTTAATCTCT
 1218 CTCTTTCACTCATATCAACATATGATATGGTACTTTCCTGCTATT
 1263 TCAATACGATTATACAAAATATCACTGGATAACCCAGGCAATAAAA
 1308 AACTAAGTGTATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig.3

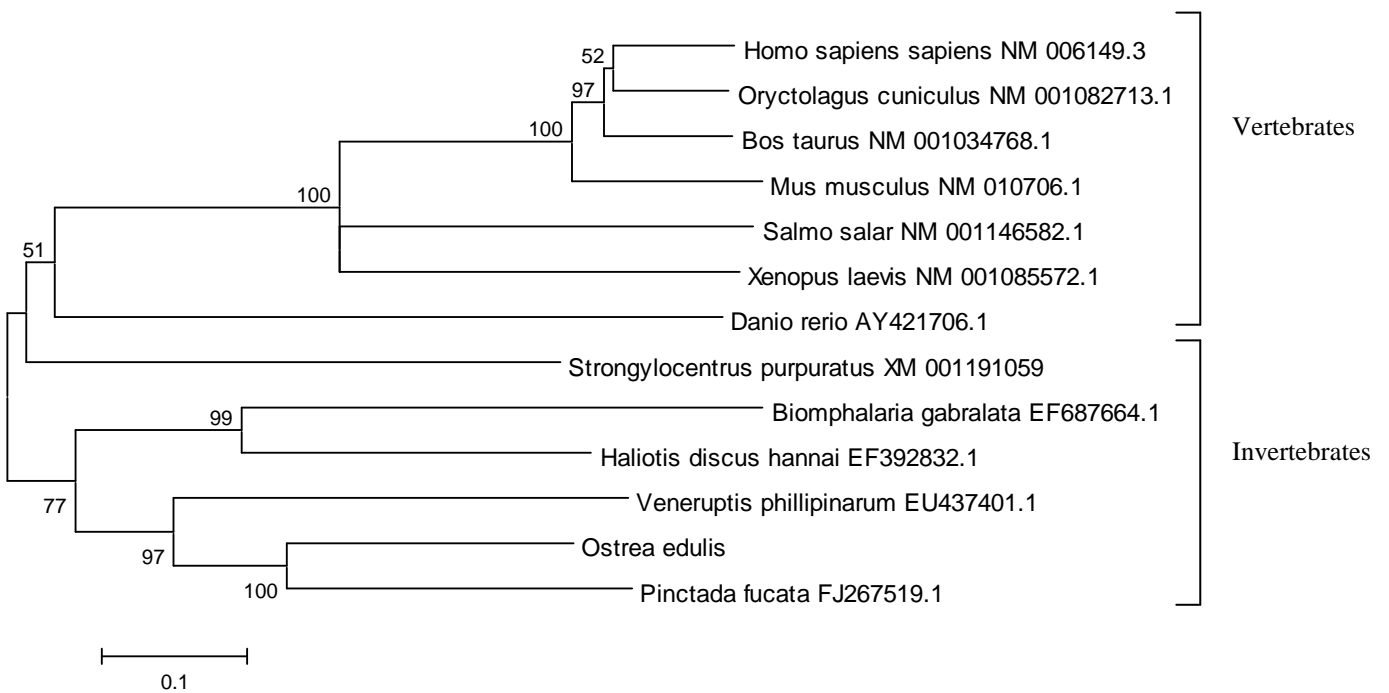


Fig.4

AAGTAGTGAGTGCCGGGCGTTGAGGAGGACGGACTATAGTACTGTCTCGATCATTAAACATTTGTGTTTAC
TGTGTTTCCAAGGAAACTA

91 TCA **ATG** GGA ATG GAC AAT ATT AGA CAG ACA GGC AGA ATA ATG ACG
1 M G M D N I R Q T G R I M T

138 AAA AAA CGT CCG GTG GAG AGG CAG AAG ATG CGG CCG TGG ATC CAG
15 K K R P V E R Q K M R P **W** I Q

183 GAC ATG TTG GAC AAT GGG GGT GTG CAA GGT TTG GAG TGG TTC GAT
30 D M L D N G G V Q G L E **W** F D

228 AAA TCG CAG AAT CTC TTT AGA ATT AAC TGG AAG CAT GGG TCC AGA
45 K S Q N L F R I N **W** K H G S R

273 CAC GGG TTC AAT ACC ACA AAA GAT GCC AGC CTC TTC GAG AAA TAC
60 H G F N T T K D A S L F E K Y

318 GCC CAA CAC ACA GGA CGT TGG GAT CCG AAT GAT CTA AAC CCC AAA
75 A Q H T G R **W** D P N D L N P K

363 AAA TGG AAG GCA AAT TTC CGA TGC GCC CTG AAC AGC CTG CAA AAC
90 K **W** K A N F R C A L N S L Q N

408 GTC ATG GAG GTG AAA AAC CTG GGT GAG AGC AAA GGT GCC CAT GCG
105 V M E V K N L G E S K G A H A

453 TAC CGC GTT TAC CAA TTT TTG CTG GAG GAG GAA ACA AAA CCA AAA
120 Y R V Y Q F L L E E E T K P K

498 GAT GGG CAT CAA AGA AAA CAC AAT AAA AAG AAA CCA GAC AAA GGA
135 D G H Q R K H N K K K P D K G

543 AAA TCA AAA AAA CTT TGC AAA TTT GAT GAT GCA ACC GAC GAA GAG
150 K S K K L C K F D D A T D E E

588 CCT GAA AAA GAG ACA TTG GAA ATA AGT AAA CAA GAA ATC GAC GAA
165 P E K E T L E I S K Q E I D E

633 CCA ATG CCC GCA TCG GAT GAA GAG GCG GCG GCC CCA CAA CAG GAC
180 P M P A S D E E A A A P Q Q D

678 ACC CCC TTA CTT ACC AAG CGA CAG GTC GAT TGC TAT ACA TAT CAG
195 T P L L T K R Q V D C Y T Y Q

723 CAC CAT ATG GCC GGA TGC ATT GTC ATA CAG AGC CCA AGA AAG AGG
210 H H M A G C I V I Q S P R K R

768 CCA GCG CCA TAC TCA ACC GAG AAA GAT GAT TGT GAA GAT CCG GTG
225 P A P Y S T E K D D C E D P V

813 GAG ATG ACG TCA TTA GAA GAC GCC CAG CTG ATG GCA CAC GCT GCA
240 E M T S L E D A Q L M A H A A

858 AAG CGA AAC AGA AGT ACC GAT GAT GAC GAA AGT TTG TCG TAT TCG
255 K R N R S T D D D E S L S Y S

903 CAG CTG TCT GTG ACT GAC GAA TCG TCA AAC ATC TCG TGC ACT TCA
270 Q L S V T D E S S N I S C T S

948 GAT TCC AGT TCC TCG AGT CCA GGA GAA GAG ACA GAC AAC GTA CCG
285 D S S S S S P G E E T D N V P

993 CAT TTC TCC AAT CTT TTA TCA GAC AAT ACG GAT GGT GAT TGG GTT

300 H F S N L L S D N T D G D W V
 1038 ATT GAA AGC GAG GAA ACT GTA ACT ACA ACC GAC TCC TGA ACG AAC
 315 I E S E E T V T T T D S *

CACTACACAAAAGTGA^{ACT}GAATACCGCAAAAATAATGACAGTAATTAACGGCGTCTACATCAATACGATGACCGCGATCAA
 CAATGCATACAGCAAGACAATGACAGTGATTAGCATTCTCTACAGCTAGACAATGACAGTGATTAGCATTCTCTACAGCTAGA
 CAATGACAGTGATTAGCATTCTCTACAGCTAGACAATGACAGTGATTAGCGATGTCTACCGATAGACAACCTGTGATTAGCGAT
 GTCTACAGCTGGGCGACAGTGATTAGCGATGTCTACAGCTGGACGACAGTGATTAGCAATGTCTACCGATAGACAACCATGAC
 TATATAGTATAAATCTTTGTGTCTACATTTGTGACTAATAGCAATGGGCAAAAAAAGAAATGTTTTTACAACCTTCGTTTTTA
 CATTGCACATGCATGTTCAATTTATCACCCCTTTTGATATTAATCATGTTTATATAAAAAACAAATCGTTAACTCACCACATTGAT
 TTTACTTTGTCAAAGTTCAGTGCAGTGATATAGTGCTTTGCATGATATTTATTGTTTTTATATGCGTTTCTCAATAAATTA
 TTTACTGTTGAATCATTGAATAAAAAAGCAGAGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig.5

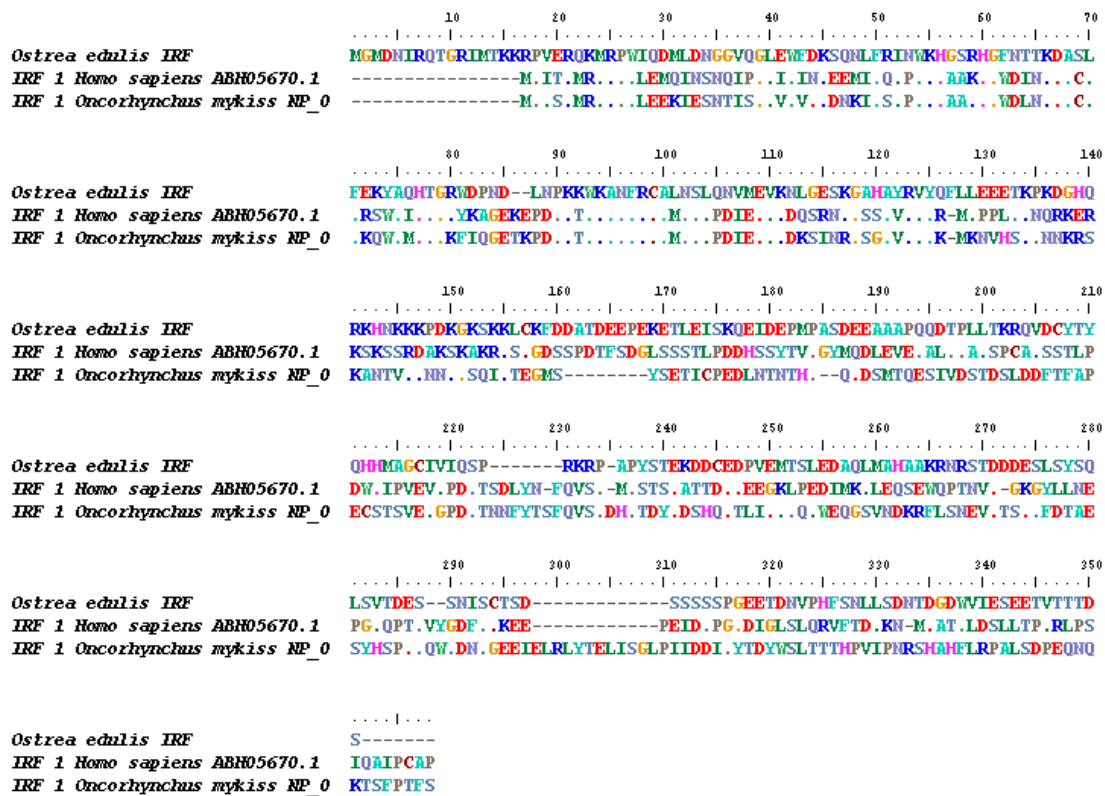


Fig.6

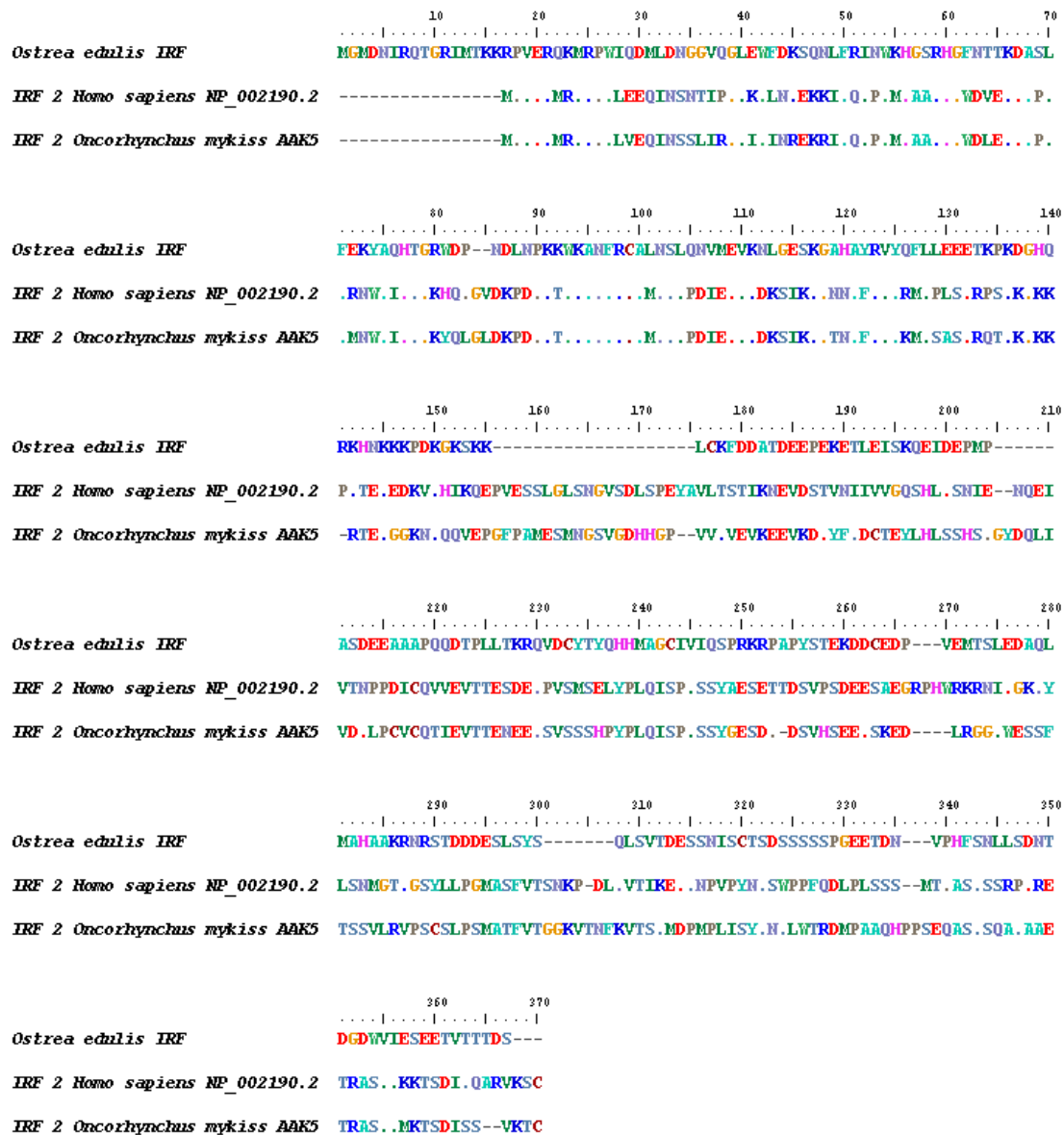
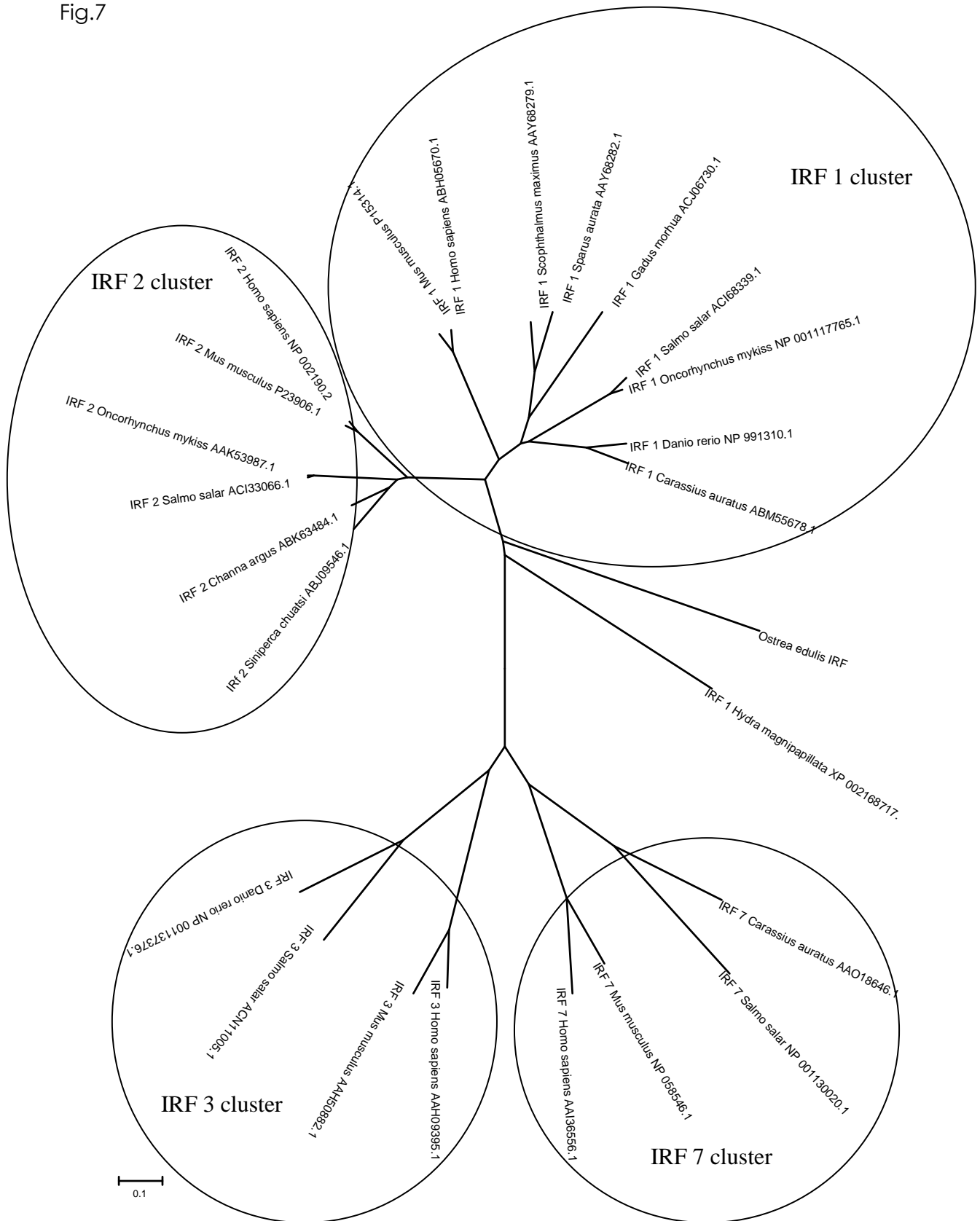


Fig.7



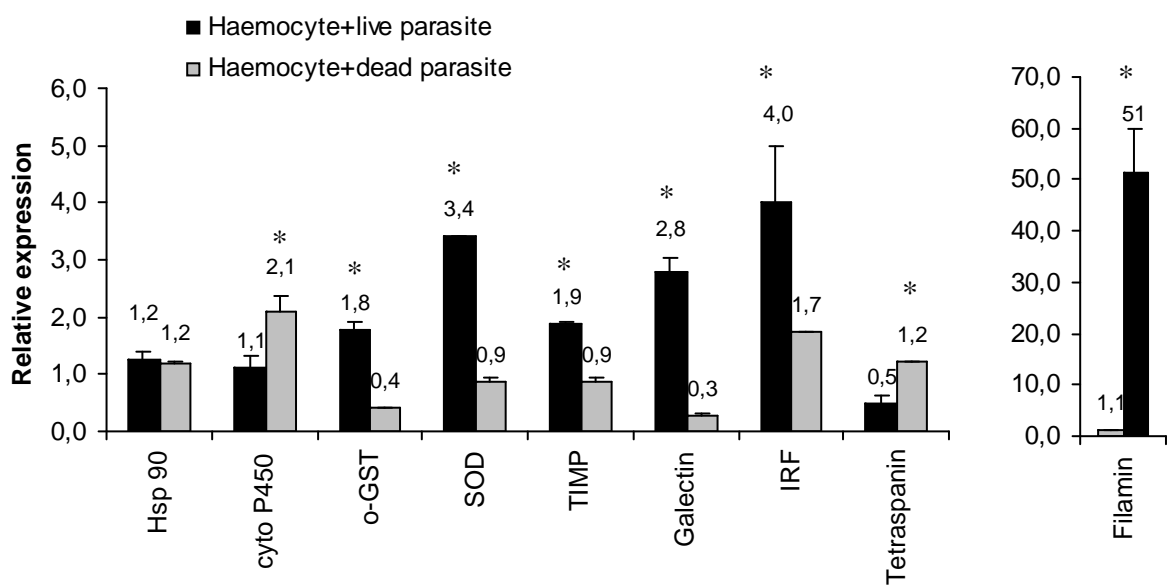


Fig.8

| Name | Oligonucleotide sequence (5'-3') | Concentration of Forward primer (μ M) | Concentration of Reverse primer (μ M) |
|-------------|---|--|--|
| Filamin | Forward: TGATTTAACCGACGGGAAAG Reverse: CTTCATCACCGGTTGTGG | 3 | 3 |
| TIMP | Forward: TTCGACGCATGTATGAAAGG Reverse: TCTGGATTCAGGCCCTA | 1.5 | 3 |
| OGST | Forward: GGCCTGCAGGGGTCAGTTT Reverse: GGTTCCCGTTCCTGAGCA | 3 | 3 |
| CYTOP450 | Forward: GTCATCAAGCGAATGCGATA Reverse: GGAGAGCTCCCTCATTTCC | 3 | 3 |
| TETRA | Forward: TTCCATCCATTGCTGATTG Reverse: AGCTGAACTCTGCCGTGAAG | 3 | 3 |
| Hsp90 | Forward: TTTGTGGAACGGGTCAAAA Reverse: AACGTCGAGCACAGTCGAG | 3 | 3 |
| OeGal | Forward: TCGGAGGTCGCCCTTAAT Reverse: TTGCCGTGAACAATCAACA | 3 | 3 |
| SOD | Forward: TCGTCAATGTCAGCGTGAA Reverse: AAATGTTGGGGCTGGTGA | 3 | 3 |
| OeIRF | Forward: GTGCAAGGTTTGGAGTGGTT Reverse: GAAGAGGCTGGCATCTTTG | 3 | 3 |
| ElongPCRQ5m | Forward: GTCGCTCACAGAAGCTGTACC Reverse: CCAGGGTGGTTCAAGATGAT | 3 | 3 |
| Topo F | GACCATGATTACGCCAAGC | | |
| Topo R | CCCAGTCACGACGTTG | | |

Table 1 Combinations of primers used in quantitative PCR assays

| | |
|--|------|
| Total number of subtracted clones | 2448 |
| Total number of clones sequenced | 864 |
| Sequences analysed | 809 |
| Total number of sequences with significant match | 226 |
| Contigs | 330 |
| Singletons | 274 |
| Redundancy | 40% |
| Average size number pb | 402 |

Table 2 General characteristics of the subtracted library and cDNA sequences from *Ostrea edulis* haemocytes.

| length | Putative homolog protein | Homolog species | e-value | Genbank Accession number |
|--------|---|--------------------------------------|---------|--------------------------|
| 361 | Cytochrome P450 | <i>Crassostrea gigas</i> | 1e-23 | ABR45717 |
| 360 | Tissue inhibitor of metalloproteinase Omega class | <i>Crassostrea gigas</i> | 3e-40 | AAW52530 |
| 475 | glutathione S-transferase | <i>Crassostrea gigas</i> | 6e-53 | CAD89618 |
| 360 | Tetraspanin | <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 1e-5 | ABE27957 |
| 614 | Interferon regulatory factor | <i>Paralichthys olivaceus</i> | 2e-22 | BAA83468 |
| 359 | Heat shock protein 90 | <i>Crassostrea gigas</i> | 2e-33 | ABS18268 |
| 376 | Galectin 4-like protein transcript variant | <i>Haliotis discus hannai</i> | 1e-21 | ABN54798 |
| 324 | Cu/Zn superoxide dismutase | <i>Crassostrea ariakensis</i> | 2e-54 | ABF14366 |
| 299 | Filamin | <i>Hirudo medicinalis</i> | 4e-20 | AAR36862 |

Table 3 Candidate ESTs selected for expression level analysis by quantitative real time PCR

II Etude la réponse moléculaire chez les hémocytes de deux populations d'huîtres plates infectés par le parasite *Bonamia ostreae*

La sélection génétique reste une possibilité afin de maintenir la production et de diminuer l'impact du parasite sur les cheptels d'huîtres plates. Un programme mené par l'Ifremer a permis d'identifier des animaux présentant des meilleurs taux de survie après plusieurs générations en zones d'endémie de la maladie. En revanche, à ce jour il n'existe aucune information sur les bases moléculaires liées à cette résistance.

Les banques soustractives d'ADNc ont permis d'obtenir 2201 clones qui ont montré une expression différentielle entre les deux conditions testées (hémocytes d'huîtres sélectionnées pour leur résistance et infectés par le parasite et hémocytes provenant d'huîtres non sélectionnées et infectés par le parasite). Le séquençage des clones différentiellement exprimés a permis d'identifier la fonction putative des protéines codées par les ESTs par recherche d'homologies dans les banques de données publiques. Il a été identifié des ESTs codant des protéines impliquées dans la détoxification cellulaire (extracellular superoxide dismutase (OeEcSOD)), et dans le système immunitaire (inhibitor of apoptosis (OelAP), OeFas-ligand, cathepsine B, cyclophiline B et C1q).

Les ESTs identifiées ont été analysées par PCR en temps réel afin de suivre leur niveau d'expression chez les hémocytes d'huîtres sensibles et résistantes infectées par le parasite *Bonamia ostreae*. Les analyses de PCR en temps réel ont permis de montrer une sur-expression d'OeEcSOD, OelAP, OeFas-ligand et cathepsine B chez les hémocytes résistant infectés. Les hémocytes provenant d'huîtres sensibles infectées présentent une sur-expression de gène codant la cyclophiline B.

En complément dans cette étude, les séquences complètes de deux gènes d'intérêt, le Fas ligand (Oefas-ligand) et l'IAP (OelAP) ont été obtenues.

Article n°2 : New insight in flat oyster *Ostrea edulis*
resistance against the parasite *Bonamia ostreae*

(Soumis Fish & Shellfish Immunology)

Benjamin Morga, Tristan Renault, Nicole Faury and Isabelle Arzul*

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer);
Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP); La Tremblade, France

Corresponding author. Mailing address: Ifremer, Laboratoire de Génétique et
Pathologie, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France. Phone:
+33 5 46 76 26 10. Fax: +33 5 46 76 26 11. E-mail: iarzul@ifremer.fr

Abstract

Bonamiosis due to the parasite *Bonamia ostreae* has been associated with massive mortality in flat oyster stocks in Europe. Control of the disease currently relies on disease management practices and transfer restriction. Previously, massal selection based on bonamiosis survival have been applied to produce flat oyster families with resistant progeny.

In an attempt to understand the molecular pathways involved in disease resistance, differentially expressed sequence tags (ESTs) between resistant and wild *Ostrea edulis* hemocytes were identified using suppression subtractive hybridisation (SSH). Sequencing of 1920 clones from two SSH libraries revealed 939 distinct sequences of which 382 shared high similarity to sequences in the public databases. Putative functions could be assigned to 342 of the sequences. Expression of seven ESTs homologous to genes previously shown to be involved in immunity was further studied using quantitative reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR). The base-line expression of an extracellular superoxide dismutase (OeEcSOD), inhibitor of apoptosis (OeIAP), OeFas-ligand and Cathepsin B were significantly increased, whilst cyclophilin B appeared significantly decreased in resistant oysters. According these results obtain in this study, it was hypothesised that resistant oysters would be able to generate an anti-parasitic response through hydrogen peroxide (H₂O₂) production and an apoptotic response by an apoptosis response though an up regulation of the OeFas-ligand. The open reading frame of the OeFas-ligand and OeIAP were completely sequenced.

Key words: *Bonamia ostreae*, Protozoan, *Ostrea edulis*, Flat oyster, Haemocytes,

Gene expression, Resistance

1. Introduction

Oyster farming is currently exposed to heavy mortality in association of the detection of pathogens (virus, bacteria and parasites) (Pichot et al., 1979 ; Renault et al., 2000). Infectious diseases lead to financial losses for oyster farmers. Treatment can not be used because oysters are mainly cultured in open areas and vaccine can not be developed because molluscs lack lymphocytes and antibodies. Consequently bivalve disease control generally relies on stock management and transfer restriction. Development of resistant animals when possible can also help to mitigate disease impacts.

Bonamia ostreae has contributed to decrease flat oyster *Ostrea edulis* production in France since the end of the seventies (Pichot et al., 1979 ; Comps et al., 1980). This protozoan is affiliated to the order of haplosporidia and to the phylum of cercozoan (Cavalier-Smith and Chao, 2001). *Bonamia ostreae* is most often observed inside the haemocytes (Pichot et al., 1979 ; Comps et al., 1980), but it can also be observed extracellularly in the digestive gland and in the gills (Montees et al., 1994). Haemocytes, the circulating cells present in haemolymph, play a key role in the immune response of molluscs. Bivalves lack specific immune system and immune memory. Their immune response relies on innate cellular and humoral mechanisms both operating in coordination to recognize and eliminate pathogens. Phagocytosis is the main cellular immune response against pathogens in molluscs (Fisher, 1998 ; Cheng, 1981 ; Feng, 1988). Thus, the better comprehension of interactions between the immune system of oysters and pathogens are key factors to understand the development of related diseases.

Selective breeding programs were initiated in Ireland and France, with the main objective of producing flat oysters tolerant to bonamiosis (Culloty et al., 2004 ; Lapègue et al., 2004). In France, this program was first initiated in 1985 by Ifremer, producing two oysters population by mass spawning (Naciri-Graven et al., 1998). Individual selection was applied through inoculation tests and field testing, the surviving oysters being used to produce the next generation. Three generations of selection were carried out in Ifremer hatchery. At that stage, microsatellite analyses showed that these strains exhibited a low genetic diversity due to population bottlenecks, leading to small effective population sizes and subsequent inbreeding (Launey et al., 2001). As a result, the second stage of this selective breeding program

consisted of the production of bi-parental families combined with within-family selection. Families produced in 1995 consisted of within-strain crosses. Then, in order to maximize genetic variability, families produced in 1998 were issued from among-strain crosses between two family previous produced (Launey, 1998). These families showed enhanced survival and lower prevalence of the parasite compared with control wild-type oysters in *Bonamia ostreae*-contaminated areas (Lapègue et al., 2004).

Such material is helpful to better understand resistance basis. As an example, in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerrata* the use of selected oyster against the parasite MSX allowed identifying genes involved in the resistance (Green et al., 2009). In the present study, a comparison of the molecular responses between a resistant population and some wild oysters was undertaken using suppression subtractive hybridization (SSH), a PCR-based technique that allows the identification of genes that are differentially expressed between two conditions. In addition, RT PCR assays were developed in order to estimate expression level of ESTs of interest during an *in vitro* infection of haemocytes from resistant and wild oysters. Finally, the open reading frames of two selected genes (OeFas-ligand and OelAP) were completely sequenced and characterized.

2. Material and methods

2.1 Biological material

2.1.1 Oysters

Eighteen-month-old flat oysters *Ostrea edulis* (n=90) were collected from Quiberon Bay (Southern Brittany, France), a bonamiosis endemic zone. They were acclimatized in the quarantine facilities of Ifremer laboratory in La Tremblade (Charente Maritime, France) over 30 days. These oysters are considered as the wild population in this study.

The resistant oysters were produced in the Ifremer hatchery from Argenton from spawners previously selected for their resistance to bonamiosis. When they were 18

months old, they were transferred and acclimatized in the quarantine facilities of Ifremer laboratory in La Tremblade (Charente Maritime, France) over 30 days.

Flat oysters were maintained in 120 l raceways supplied with a constant flow of seawater enriched in phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracialis* and *Tetraselmis succica*).

2.1.2 Haemolymph collection

Haemolymph was withdrawn from the adductor muscle using a 1mL syringe equipped with a needle (0.40x90mm). Haemolymph samples were filtered on a 75 µm mesh to eliminate debris and maintained on ice to prevent cell aggregation. Haemolymph samples were pooled. Haemocyte counts were performed using a Malassez cell and cell concentration was adjusted at 2.10^6 cells mL⁻¹ with filtered seawater at 0.22 µm (FSW).

2.1.3 Parasites

Bonamia ostreae was purified according to a previously published protocol (Mialhe et al. 1988). Briefly, heavily infected oysters were selected by examination of heart tissue imprints using light microscopy. After homogenization of all the organs except the adductor muscle, the parasites were concentrated by differential centrifugation on sucrose gradients and then purified by isopycnic centrifugation on a Percoll gradient. Finally, the purified parasites were suspended in FSW. *Bonamia ostreae* cells were then counted using a Malassez-cell and parasite concentration was adjusted at 10.10^7 cells mL⁻¹ with FSW.

2.2 *In vitro* infection protocol

In vitro infection experiment including infected haemocytes from resistant oysters and infected haemocytes from wild oysters was performed in order to construct forward and reverse SSH libraries.

The expression level of some genes identified through SSH was then evaluated through a second *in vitro* experiment including two conditions i.e. (1) infected haemocytes from resistant oysters and (2) infected haemocytes from wild oysters.

Whatever was the experiment, haemocytes were maintained in contact with purified parasites during 2 hours. For that purpose, 5 ml of haemocyte suspension were introduced in plastic cell culture flasks and incubated at 15°C for two hours until the formation of a cell layer. Supernatant was then withdrawn, preserved after 0.22 µm filtration and replaced by 500 µl of parasite suspension. After 2 hours, supernatant previously filtered at 0.22 µm to eliminate bacteria, was introduced again in flasks. After 12-hour incubation, cells were rinsed twice with phosphate buffer saline (PBS 1X) and were processed for RNA extraction using TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

2.3 Suppression subtractive hybridisation (SSH)

One µg of mRNA from the haemocytes exposed to the parasite and 1 µg of mRNA from the haemocytes alone were used as templates for the SSH following the PCR-select cDNA subtraction kit procedure (Clontech, Palo Alto, CA) (Diatchenko et al., 1996). Forward subtraction was carried out using the haemocytes from resistant oysters exposed to the parasite as the tester and the haemocytes from wild oysters exposed to the parasite as the driver. The opposite was performed for reverse subtraction. PCR products were cloned using TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). White colonies were screened by macro-arrays. Inserts were PCR amplified using TOPO F and R primers (Table 1) and one microliter of PCR products was spotted in duplicate onto nylon membrane (Roche Diagnostic). cDNA was digoxigenin labelled and used as probe in hybridisation experiments using the DIG-labelling and detection kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostic).

2.4 Sequencing and sequence analysis

Clones showing a differential digoxigenin labelling intensity between tested conditions were selected and amplified using TempliPhi™ DNA Sequencing Template Amplification Kit (Amersham's). PCR products isolated from individual clones were sequenced in one way with TOPO F with the sequencing kit ABI BigDye® terminator version 3.1 using an ABI PRISM® 3130 XL-Avant Genetic Analyzer, a 36 cm capillary array and POP 7 polymer. Chromatograms were analyzed with Chromas 231 software. Sequences were then analyzed with BlastX algorithm available from the

National Center for Biotechnology Information (NCBI). EST sequences were then submitted to dbEST and GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Only E values less than 10^{-4} were considered significant.

2.5 Identification and characterization of immune-related genes

In order to obtain the complete open reading frames (ORF) of Fas-ligand (OeFas-ligand) and inhibitor of apoptosis, IAP (OeIAP), RACE PCR reactions were carried out using SMART RACE cDNA Amplification Kit from Clontech according to the manufacturer's instructions. 5' and 3' primers were designed using primer 3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (5'racefas TGAGTTAGCCCTGTTCTCCACCAG, 3'racefas CTGGTGGAGAACAGGGCTAACTCA; 5'racelAP CCTCCATGTCAAAAATCACATTAGC, 3'racelAP ATGTGATTTTGACATGGAGGAGAG). After ligation and cloning in TOPO Vector System (Invitrogen) and transformation in Top 10 competent bacteria (Invitrogen), several clones were sequenced using the same protocol as described before. Open reading frames were identified using the ORF finder in NCBI. Complete sequences were deposited in GenBank and assigned under the accession numbers GU320694 (OeFas-ligand) and GU814273 (OeIAP). The isoelectric point and molecular mass were calculated in http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html.

2.6 Phylogenetic analysis of OeFas-ligand

The sequence of the complete ORF of OeIRF-like was aligned with Fas ligand, TNF alpha and lymphotoxin alpha genes from GenBank database (Fas ligand: *Homo sapiens sapiens* NM 000639.1, *Mus musculus* NM010177.3, *Rattus norvegicus* NM012908.1, *Macaca mulatta* AB035139.1, *Sus scrofa* AB069764.1, *Haliothis discus discus* ASJ12607; TNF alpha: *Homo sapiens sapiens* M10988.1, *Mus musculus* U68414.1, *Rattus norvegicus* X66539.1, *Sus scrofa* X57321.1, *Bos Taurus* NM173966.2, *Xenopus tropicalis* AM041993.1, *Oreochromis niloticus* AY428948.1, *Paralichthys olivaeus* AB040448.1, *Ictalurus punctatus* AJ417565.2, *Salmo salar* NM001123589.1; Lymphotoxin alpha: *Homo sapiens sapiens* X01393.1, *Rattus norvegicus* NM080769.1, *Sus scrofa* NM214453.1, *Bos Taurus* Z14137.1, *Xenopus tropicalis* AM041994.1).

Alignments were performed using the Clustal W (Thompson et al., 1997) including in MEGA 4 (Tamura et al., 2007). A phylogenetic tree based amino acid sequences was designed using the Neighbour-Joining (NJ) (Saitou et al., 1987) algorithm with the MEGA 4 software program. Statistical confidence on the inferred phylogenetic relationships was assessed by bootstrap of 1000 replicates.

2.7 Expression analysis of selected ESTs by quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed in TRIZOL, RNA was separated from DNA and proteins using phenol chloroform. Total RNAs were precipitated using isopropanol. The RNA pellet was washed with 75% ethanol solution and finally eluted in 22 µl of DEPC water. The RNA concentration was determined using a spectrophotometer at 260nm and RNA quality was assessed on a 1% agarose gel. Total RNAs were treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) to remove remaining genomic DNA.

First strand cDNA was synthesized using the oligo(dT) anchor primer (5'-GAC CACGCGTATCGATGTCGACT(16)V-3') and Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) reverse transcriptase SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

For each of the selected genes, forward and reverse primers were designed using primer 3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Table 1). Real-time quantitative PCR reactions were duplicated and performed in a total volume of 25 µL using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Stratagene) in 96-microwell plates. Each well (25 µL) contained 5 µL of cDNA dilution (1/30), 12.5 µL of Brilliant® SYBR® Green II PCR Master Mix (Stratagene), 2.5 µL of each diluted primer (3µM) and 2.5 µL of distilled water. Thermal cycling conditions were: 1 cycle of activation of Hot start Taq polymerase at 95 °C for 10 min; 40 cycles of amplification at 95°C for 10 s, 60°C for 30 s; and melting temperature curve analysis at 95°C to 60°C by 0.5°C decrease of the temperature every 10 s. In all cases, negative controls (without cDNA) were included to rule out DNA contamination.

For each candidate gene, melting curve and gel picture were analysed in order to verify the specificity of the amplified products and that at a single PCR product was

amplified. PCR efficacy (E) was calculated for each primer pair by determining the slopes of standard curves. These curves were generated using a serial dilutions analysis of plasmid containing the insert of interest. Amplification efficacies were calculated according to the following equation $E=10^{(1-slope)}$ (Pfall, 2001).

The expression of the candidate genes was normalized using the elongation factor 1 alpha (EU651798) as the housekeeping gene. Primers are shown in Table 1 (Morga et al submitted). Fold units were calculated using the method described by (Pfall, 2001).

3. Results

3.1 ESTs identification

The SSH technique was used to identify transcripts differentially expressed between infected haemocytes from resistant oysters and infected haemocytes from wild oysters. Two thousands and two hundred eight clones were sequenced and 1920 sequences (95% of the sequenced clones) were obtained and analysed (see Table 2). These sequences ranging from approximately 152 to 670 bp in length were analysed for the redundancy by multiple alignments using the Lasergene software. Finally, 909 unique ESTs were identified including 333 contigs and 606 singletons. Among these, 382 ESTs showed similarities with genes available in databases with an E value < 10⁻⁴ clustering in 8 main categories according to their putative biological functions (Fig. 1); (1) detoxification, (2) cell communication, membrane receptor and immune system, (3) ribosomal protein, (4) cytoskeleton structure, (5) respiratory chain, (6) cell cycle, DNA repair, protein regulation and transcription, (7) cell metabolism and (8) hypothetical proteins.

3.2 Characterization of *Ostrea edulis* immune-related genes

3.2.1 Ostrea edulis Fas-ligand (OeFas-ligand)

Ostrea edulis cDNA OeFas-ligand showed a 1097 nucleotide (nt) sequence. The sequence contained a short 5'-untranslated region (1-29 nt) followed by an ORF of

863 nt (287 codons: 30-893 nt) and finished by a 3'-untranslated region (894-1097 nt) (Fig. 2). The complete ORF product had a putative molecular mass at 32 442.70 Da and a predicted isoelectric point at 6.75. The analysis of the ORF product revealed the presence of the transmembrane domain (MIFSCAVNVVLAIVFGVLVGLNW) and a TNF domain (154-257). Moreover, three N-glycosylation sites at ⁵⁷NATV⁶⁰, ⁸⁵NETL⁸⁸ and ¹²⁵NSSS¹²⁸ could be identified. Signal peptide prediction results showed that there was a putative signal peptide in the OeFas-ligand (MSAPSSRNCKCFMIFSCAVNVVLAIVFGVLVG).

Phylogenetic tree analysis of Fas ligand, TNF alpha and lymphotoxin alpha grouped OeFas-ligand within the Fas ligand clade and showed closest affinity to abalone *Haliotis discus hannai* (Fig. 3).

3.2.2 *Ostrea edulis* Inhibitor of Apoptosis (OeIAP)

Ostrea edulis cDNA of IAP (OeIAP) gene was composed of 1241 nucleotides (nt) in length. The sequence contained a short 5'-untranslated region (1-16 nt) followed by an ORF of 1076 nt (377 codons: 17-1150 nt) and finished by a 3'-untranslated region (1151-1241 nt) (Fig. 4). The complete ORF product showed a molecular mass at 41646.89 Da and predicted isoelectric point at 5.63. ScanProsite analysis revealed that the predicted OeIAP protein contained one BIR domain (93-158 aa), followed by a RING domain (330-365) at its C terminus. Moreover, it was identified one N-glycosylation sequence at ⁵¹NETD⁵⁴. The BIR domain of OeIAP had the conserved BIR motif of CX₂CX₆WX₃DX₅HX₆C (Deveraux and Reed, 1999). OeIAP is more similar to the ML-IAP (livin), a human IAP that contains a single BIR and RING finger domain than to IAP identified in invertebrates. The multiple alignment of BIR domains from *Penaeus monodon* IAP (*PmlAP* ABO38431.1), *Drosophila melanogaster* (*DIAP1* Q24306.2) and (*DIAP2* AAF58095.1) and *Homo sapiens sapiens* ML-IAP (*livin* NP_647478.1) showed a 62% of identity with the BIR3 from *PmlAP* (Fig. 5). The multiple alignment of RING domain between Oe-IAP RING domain and the *DIAP1*, *DIAP2*, *PmlAP* and *livin* RING domain show 61% of identity with *livin* RING domain (Fig. 5).

3.3 Haemocyte expression of selected ESTs

In order to verify that differential expression of genes identified by SSH existed between resistant and wild oysters, qRT-PCR was carried out to determine the relative expression of the target genes. SSH libraries allowed identifying seven ESTs potentially involved in the resistance or susceptibility to bonamiosis. Significant differences in expression were observed between resistant and wild oysters for five of the seven transcripts. OeEcSOD, OeIAP, OeFas-ligand and Cathepsin B were found to be respectively 2.4, 6.5, 3.8 and 3.6-fold over expressed in resistant oysters compared to wild ones, respectively (Fig. 6). Cyclophylin B was 0.07 fold less expressed in resistant oysters (Fig. 6). No significant difference was found in the expression of Oe-C1q and ferritin between resistant and wild oysters by qRT-PCR (Fig. 6).

4. Discussion

In the present study, we have investigated the interactions between haemocytes from two populations (resistant and wild) and the parasite *Bonamia ostreae*. Molecular responses were studied using suppression subtractive hybridization method (SSH) and real time PCR method. SSH has already been used to better understand host/pathogen interactions at a molecular level in different bivalve species including *Crassostrea gigas* (Gueguen et al., 2003), *Crassostrea virginica* (Tanguy et al., 2004), *Saccostrea glomerata* (Green et al., 2009), *Ruditapes philippinarum* (Kang et al., 2006) and *Ruditapes decussates* (Prado et al., 2009).

In our study, this method allowed the identification of 1920 ESTs differentially expressed between infected haemocytes from resistant and wild oysters. Among the ESTs presenting a significant homology in Genbank, seven ESTs were selected according to their putative biological function. The expression pattern of these ESTs was measured in an *in vitro* infection experiment. Real-time PCR analysis confirmed the differential expression of five out of the seven ESTs (more than one fold difference).

The putative cyclophilin gene was significantly down regulated in infected haemocytes from resistant oysters. On the contrary, cyclophilin was found up-regulated in response to the bacteria *Vibrio splendidus* 10 hours after inoculation in resistant cupped oyster *Crassostrea gigas* (Huvet et al., 2004). Cyclophilin, a peptidylprolyl isomerase is known in mammals to accelerate the folding of proteins and to mediate signalling events leading to T-cell activation (Shida et al., 2003).

A transcript with homologies with Oe-C1q was identified and could be fully characterized by RACE PCR (data not shown). C1q gene was also identified in previous studies as *Mercenaria mercenaria* and *Ruditapes decussates* (Perrigault et al., 2009 ; Prado et al., 2009). C1q is the target recognition of the classical complement pathway that is crucial for the clearance of pathogens in vertebrates (Kishore and Reid, 2000) and invertebrates (Zang et al., 2008). The C1q gene was significantly up regulated in *Mercenaria mercenaria* and *Ruditapes decussatus* in response to QPX and *Perkinsus olseni*, respectively (Perrigault et al., 2009 ; Prado et al., 2009) while in our study the expression of this gene was not affected by the presence of *Bonamia ostreae*. Although C1q gene was identified in *Saccostrea glomerata* resistant population to the parasite *Marteilia sydneyi*, the expression of this gene appeared not modulated in resistant population compared to wild oyster population (Green et al., 2009).

Ferritin has been classified as a stress protein (Gueguen et al., 2003) and has also been associated with defence mechanisms because of its role in the regulation of iron availability to infectious agents (Ong et al., 2006). Previous studies demonstrated an increase of ferritin expression in invertebrates following exposures to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or bacterial challenge (Beck et al., 2002 ; Gueguen et al., 2003 ; Ong et al., 2005). Perrigault et al., (2009) have reported an increase of ferritin expression in clams challenged by Quahaog parasite X (QPX) after 28 and 48 days.

The over expression of Oe-EcSOD gene in resistant flat oysters might be related to an increased production of cytotoxic components generated during an immune response as shown by Green et al., (2009) in *Saccostrea glomerata*. SOD is known to be involved in the regulation of oxidative stress response. Morga et al., submitted have shown that Oe-EcSOD presented a high sequence homology with other bivalve ecSODs, notably Dominin from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*

(Tanguy et al., 2004), with Carvortin from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Scotti et al., 2007) and with ecSOD from *Saccostrea glomerata* (Green et al., 2009). One of the mechanisms to fight against *B. ostreae* in resistant *Ostrea edulis* could be their ability to generate hydrogen peroxide at a faster rate and to higher concentrations than wild flat oysters during respiratory burst. Oe-EcSOD would be capable of generating hydrogen peroxide by conversion of superoxide anion (O_2^-). However, the true biological function of bivalve ecSOD is disputed within the literature (Gonzalez et al., 2005 ; Scotti et al., 2007). A previous study showed a significant decrease of reactive oxygen species (ROS) production in wild flat oyster haemocytes after an *in vitro* infection of *Ostrea edulis* haemocytes with live parasites versus haemocytes alone (Morga et al. 2009). Moreover a recent study on the relative expression of this gene after an *in vitro* infection of haemocytes from wild flat oyster with the parasite *Bonamia ostreae* revealed a down regulation of Oe-EcSOD after 1h of contact (Morga et al., submitted). An increased production of SOD in resistant oysters may be regarded as an advantage in controlling negative effects of ROS production on host cells

We have identified three genes over expressed in resistant oysters in response to the infection with the parasite *Bonamia ostreae*. Cathepsins have recently been shown to be associated with cell death regulation (Foghsgaard et al., 2001 ; Guicciardi et al., 2001 ; Roberg et al., 2002 ; Lockshin and Zakeri, 2004). Cathepsins have often been considered as intracellular proteases capable of mediating caspase-independent cell death (Lockshin and Zakeri, 2004). The involvement of cathepsins in apoptosis could be related to the identification of two others genes involved in this pathway. For the first time, we have fully characterized two members of the apoptosis pathway (OeFas ligand and OeIAP) in a mollusc bivalve. Apoptosis (programmed cell death) is a common physiological process that eliminates unwanted or diseased cells, and it plays important roles in embryogenesis, homeostasis, metamorphosis and immunity (Vaux and Korsmeyer, 1990 ; Steller and Grether, 1994 ; Opferman and Korsmeyer, 2003 ; Zang et al., 2005)The mammalian extrinsic apoptosis pathway is regulated by various genes and factors, including Fas (APO-1 or CD95), Fas ligand (CD95 ligand) and tumor necrosis factor (TNF) and related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL). It is well known that the Fas and Fas ligand (FasL) system plays a central role in apoptosis (Opferman and Korsmeyer,

2003). Fas is a type I transmembrane glycoprotein that mediates apoptosis and its biological ligand (Fas ligand) induces apoptosis through the binding to Fas (Curtin and Cotter, 2003).

The over expression of the OeFas ligand in infected haemocytes from resistant oysters suggested that the product of this gene is involved in the immune response against the parasite *Bonamia ostreae*. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) are a conserved group of proteins that regulate apoptosis in both vertebrates and invertebrates. Since the first discovery of an IAP gene in a baculovirus (Crook et al., 1993), numerous cellular IAP homologues have been identified (Deveraux and Reed, 1999 ; Salvesen and Duckett, 2002). The hallmark of an IAP protein is the presence of one to three copies of a zinc-binding baculoviral IAP repeat (BIR) domain. These BIR domains bind directly to the caspases to inhibit them, and they are essential for the anti-apoptotic properties of the IAPs (Deveraux et al., 1997 ; Roy et al., 1997). The structure of the OelAP is more similar to the ML-IAP (Iivin) from human (Kasof and Gomes, 2001 ; Vucic et al., 2002) but the multiple alignment of the BIR domain from OelAP with other BIR domain from other species showed a high identity with the BIR3 domain from *Penaeus monodon*. The over expression of the OelAP suggest an involvement of this gene in the apoptosis pathway and more particularly in the regulation of the haemocyte apoptosis. These results suggest that resistant oysters may eliminate or limit the development of the parasite through apoptosis induction by an increased production of OeFas-ligand. Induction of apoptosis in resistant oysters may allow limiting the development the disease and differing the mortality of the host. At the same time the induction of the anti-apoptotic gene OelAP may suggest (1) a host feed-back control of parasite-induced apoptosis or (2) an active phenomenon mediated by the parasite itself in order to survive inside the host. For the host, apoptosis can be interpreted as a positive event in order to eliminate parasites, but also as a negative one implicated in pathogenesis through cell death. Moreover, in the present study, gene expression has not been differentiated depending on haemocyte cell types, As haemocytes are represented by several types, apoptotic events could be different depending of the cell type. The manipulation of the host apoptosis by intracellular parasites is currently described in vertebrate and invertebrate hosts (Heussler et al., 2001). Mammalian intracellular parasites are able to trafficking the apoptosis, such as *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzii*, *Plasmodium sp.*, *Cryptosporidium parvum* (Lüder et al., 2001).

Macrophages and T cells infected by the parasite *Toxoplasma gondii* are able to induce apoptosis by the Fas-ligand and a inhibition of the apoptosis has been reported in the macrophage and different cell lines by the up regulation of the anti-apoptotic homolog such as Bcl-2 and the murine anti-apoptotic protein A1 (Orlowsky et al., 1999). Finally, Hughes et al., (2010) have reported that apoptosis is involved in the *Crassostrea virginica* response against *Perkinsus marinus*. Moreover Prado et al., (2009) have identified a DAD-1 (defender against apoptotic cell death) in *Ruditapes decussatus* in response to *Perkinsus olseni*. These results suggest that apoptosis plays a potential key role in the immune response in mollusc bivalves against protozoan parasites.

The present study represents the first investigation in the resistant flat oyster molecular response against the parasite *Bonamia ostreae*. This study has also generated new data concerning the host genome and secondly contributed to a better understanding of the molecular basis involved in the resistance to *Bonamia ostreae* infection. SSH has allowed the identification of genes potentially involved in the resistance. The over expression of the Oe-EcSOD might translate a high participation of the ROS production in resistant oyster. Moreover, the identification and over expression of cathepsin B, OeFas-ligand and OelAP suggested the involvement of the apoptosis pathway in the response of flat oyster against the intracellular parasite *B. ostreae*.

Acknowledgement

The Région of Poitou Charentes supported in part this research. The authors thank Raphael Brizard for technical assistance for the maintenance of oysters in IFREMER La Tremblade quarantine facilities.

References

- Beck G., Ellis T.W., Habicht G.S., Schluter S.F., Marchalonis J.J., 2002. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Dev Comp Immunol.* 26,11-26.
- Cavalier-Smith T. and Chao E.E., 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist.* 143, 341-358.
- Cheng T.C., 1981. Bivalves. In: N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley, Editors, *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press. London. 233-299.
- Comps M., Tige G., Grizel H., 1980. Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* (L.). *C. R. Acad Science Paris.* 290, 383-385.
- Culloty S.C., Cronin M.A., Mulcahy M.F., 2004. Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237, 41-58. Curtin J.F. and Cotter T.G., 2003. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.* 15, 983-992.
- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Syerdlov E.D., Siebert P.D., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12, 6025-6030.
- Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C., 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 388, 300-304.
- Feng, S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fisheries Society. Special Publication.* 18, 153-168.
- Fisher S.W., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In: M. Brehélin, Editor, *Immunity in invertebrates.* 25-35.
- Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D., Lademann U., Bastholm L., Boes M., Elling F., Leist M., Jäättelä M., 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol.* 153, 999-1009.
- Gonzalez M., Romestand B., Fievet J., Huvet A., Lebart M.C. and Gueguen Y., Bachère E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun.* 338, 1089-1097.
- Green T.J., Tom J., Dixon T.J., Devic E., Adlard R.D. Barnes A.C., 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 799-810.
- Gueguen Y., Cadoret J-P., Flament D., Barreau-Roumiguière C., Girardot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère E., Escoubas J-M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene.* 303, 139-145.
- Guicciardi M.E., Miyoshi H., Bronk S.F., Gores G.J., 2001. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *Am J Pathol.* 159, 2045-2054.
- Heussler V.T., Küenzi P., Rottenberg S., 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol.* 31, 1166-76.
- Hughes F.M., Foster B., Grewal S., Sokolova I.M., 2010. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 247-257.
- Huvet A., Herpin A., Lionel D., Labreuche Y., Samain J-F., Cunningham C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211-220.
- Kang Y.S., Kim Y.M., Park K.I., Kim Cho S., Choi K.S., Cho M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in haemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (*Bivalvia: Mollusca*) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev Comp Immunol.* 30, 1119-1131.
- Kasof G.M., Gomes B.C., 2001. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem.* 276, 3238-46.

- Kishore U. and Reid K.B.M., 2000. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*. 49, 159-170.
- Lapègue S., Bédier E., Goyard E., Dégremont L., Baud J.-P., Gérard A., Gouletquer P., Boudry P., 2004. Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole: l'exemple de l'ostréiculture. In: Trente ans de crevetticulture en Nouvelle- Calédonie. Actes Colloq. IFREMER 38, 113-121.
- Launey S., 1998, Marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. : caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles. Thèse de doctorat. Institut national agronomique Paris-Grignon.
- Launey S., Barre M., Gerard A., Naciri-Graven Y., 2001. Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genet Res.* 78, 259-70.
- Lockshin R.A. and Zakeri Z., 2004. Caspase-independent cell death?. *Oncogene*. 23, 2766-2773.
- Lüder C.G., Gross U., Lopes M.F., 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol.* 17, 480-6.
- Mialhe E., Bachere E., Chagot D., Grizel H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture*. 71, 293-299.
- Montes J., Anadon R., Azevedo C., 1994. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 1-6.
- Morga B., Arzul I., Chollet B., Renault T., 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 836-842.
- Naciri-Graven Y., Martin A.-G., Baud J.-P., Renault T., Gérard A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 224, 91-107.
- Ong D.S.T., Wang L.H., Zhu Y., Ho B., Ding J.L., 2005. The response of ferritin to LPS and acute phase of *Pseudomonas* infection. *J Endotoxin Res.* 11, 267-280.
- Ong D.S.T., Ho J.Z.S., Ho B., Ding J.L., 2006. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology.* 211, 295-314.
- Orlowsky A., Somogyi R.D., Weiss L.M., Prystowsky M.B., 1999. The murine antiapoptotic protein A1 is induced in inflammatory macrophages and constitutively expressed in neutrophils. *J. Immunol.* 163, 412-419.
- Perrigault M., Tanguy A., Allam B., 2009. Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX). *BMC Genomics* 10, 377-387.
- Pfall MW., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29, 2002-2007.
- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., Rabouin M.A., 1979. Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 43, 131-140.
- Prado-Alvarez M., Gestal C., Novoa B., Figueras A., 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 72-83.
- Renault T., Le Deuff R.M., Chollet B., Cochennec N., Gérard A., 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis Aquat Organ.* 42,173-83.
- Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C., 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16, 6914-6925.
- Saitou N. and Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4, 406-425.
- Salvesen G.S. and Duckett C.S., 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 401-410.

- Scotti P.D., Dearing S.C., Greenwood D.R., 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zeal J Mar Freshwater Res* 41, 91-101.
- Steller H. and Grether M.E, 1994. Programmed cell death in *Drosophila*. *Neuron* 13, 1269-1274.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1596-1599.
- Tanguy A., Guo X., Ford S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Gene*. 338, 121-131.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Vaux D.L. and Korsmeyer S.J., 1990. Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
- Vucic D., Deshayes K., Ackerly H., Pisabarro M.T., Kadkhodayan S., Fairbrother W.J., Dixit V.M., 2002. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *J Biol Chem.* 277, 12275-12279.
- Zhang A., Wu Y., Lai H.W.L., Yew D.T., 2005. Apoptosis – a brief review, *Neuroembryology*. 3, 47-59.
- Zhang H., Song L.S., Li C.H., Zhao J.M., Wang H., Qiu U., Ni D.J., Zhang Y., 2008. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 281-289.

Figure captions

Figure 1 Functional classification of the sequences identified in both libraries (ESTs). Genes were clustered into 8 categories according to their putative biological function.

Figure 2 Complete ORF nucleotide and deduced amino acid sequences of the flat oyster OeFas-ligand. ORF contains a peptid signal (highlighted in grey), a transmembrane domain (underlined in black) and a TNF domain (dotted in black). N-glycosylation site were surrounded.

Figure 3 Neighbour-joining tree showing phylogenetic analysis of Fas ligand, TNF alpha and lymphotoxin sequences from various species. The tree is based on 1000 bootstrap replications. The scale for branch length (0.1 substitutions/site) is shown below the tree.

Figure 4 Complete ORF nucleotide and deduced amino acid sequences of the flat oyster OeIAP. ORF contains a BIR domain (underlined in black) and a RING finger domain (dotted in black). Signature amino acids were highlighted in grey. N-glycosylation site were surrounded.

Figure 5 Multiple sequence alignments of the BIR and RING domains of OeIAP with the corresponding domains of other IAP family members *Penaeus monodon* IAP (*PmlAP* ABO38431.1), *Drosophila melanogaster* (*DIAP1* Q24306.2) and (*DIAP2* AAF58095.1) and *Homo sapiens sapiens* ML-IAP (*livin* NP_647478.1). Identical residues are indicated in black and similar residues are indicated in grey.

Figure 6 Relative expression by quantitative PCR of selected transcripts from SSH (OeIAP, OeFas-ligand, OeEc-SOD, OeC1q, ferritin cathepsin B and cyclophillin) libraries. Expression levels were normalized to EF1- α and presented as relative expression to controls (mean \pm SD, n = 2). * indicates significant differences of gene expression compared to controls

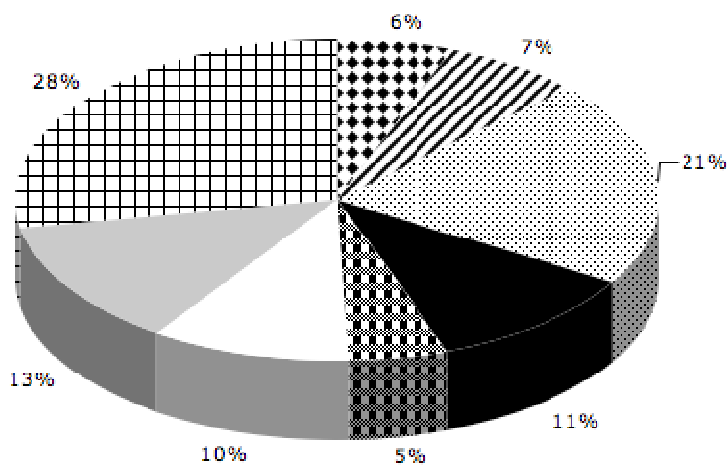
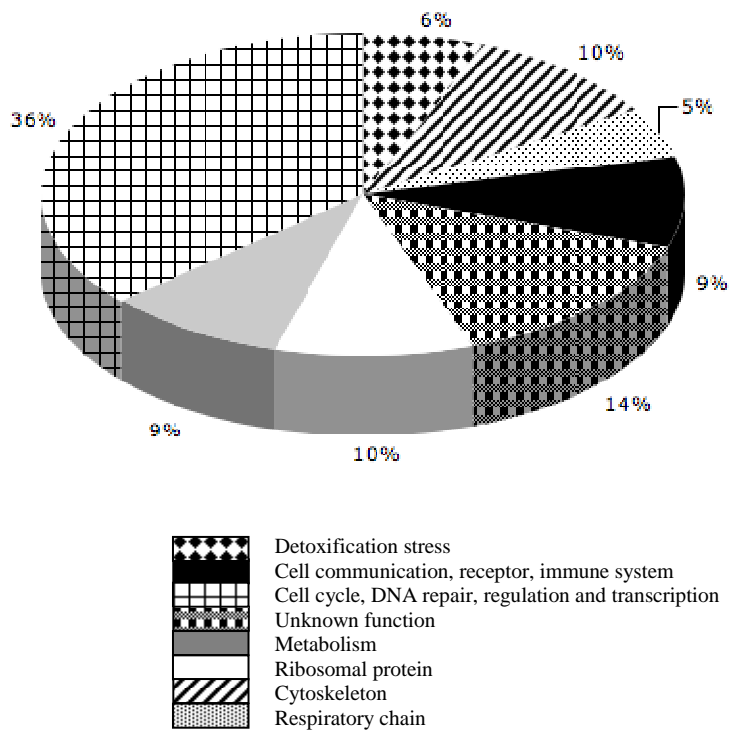


Fig. 1

```

10      20      30      40      50      60      70      80
1  TA CGCGGGG GA GA TCAAAA CA CATT CA GGA TGA GTGCTCCA TCGA STCGAAA TTGCAA GTGCTT CATGA TATTTT CCGT 80
      [REDACTED]

90      100     110     120     130     140     150     160
81  GCAATAAA TGTGGTA CTTGGGA TAGTATTTGGCGTGTGGTAGGA CTGAA TTGGGA CAAA TTA CTTGA CAA CTATTTT CG 160
      [REDACTED] L N W D K L L D N Y F R

170     180     190     200     210     220     230     240
161  GTTTTCAA CTTGGGA GA CTCCA CAA TCA GTGA TCGGAAA TGCAA CTGTAA GCGGGAAA GCCATAA CGA TTA GA GA CTCTG 240
      F S N S E T P Q S V I G N A T V S G K A I T I R D S

250     260     270     280     290     300     310     320
241  TTTGTTTT CTTGTGA CTATTTGGGCA GTGGTGA A GTGTA A TGA A CA CTAT A CGA GGA A A TCGTTA CAA CAGATTGT 320
      V C F S C D Y L G S G V S V N E T L Y E E I V T T D C

330     340     350     360     370     380     390     400
321  AAA CA CAAA CTGTGCTGCA TAAAA GA CAA A GTGA TCCA TGA TTTTGTGA TAGGA CTCAAA A TGA AAA TAA CGAAA A TGA 400
      K H K L C C I K D K V I H D F V I A T Q N E N N E N E

410     420     430     440     450     460     470     480
401  AAA CAGTT CA TCAA TTAGGGA TTCOTTGCGCTGGTGA GAAA CA GGGCTAA CTCA GCCCA TTTCTA TCTGGA CCGGGAA A 480
      N S S S I R D S F A W W R N R A N S A H F Y L D R E

490     500     510     520     530     540     550     560
491  TCCCGTA TCAAAA GAAAA CAAA CTTCGTTGGAAA GCTGA CGA TA CA TA TGGGA CTGCA TTTGCA CAA GA TA TAGTTCTT 560
      I P V S K E N K L R W K A D D T Y G T A F A Q D I V L

570     580     590     600     610     620     630     640
561  GTCAA TGGAA CTCA CATGA GAA TCAAA CAA GA TGGAA TCTA CTTCA TCTA CA CTTCCA CCA CCTT CGA CCA TAGTA GGCA 640
      V N G T H M R I K Q D G I Y F I Y T S T T F D H S R Q

650     660     670     680     690     700     710     720
641  GGA CA CCGTGGAA CCA TCTA TCAAA GTCTGA TCAA GTA CCA CCTTATTTA CCAAA GA CA GGC GA CGTGA CCTCGTTT 720
      D T V E T I Y Q S L I K Y H P Y L P K T G D V D L V

730     740     750     760     770     780     790     800
721  TCA GCAA GTTTGGTGA TCCCGTGA A CTGA CA GA CAT CA CA CAAA TTTTGGCA GGA GTGTTCAA GCTGGAA CCGGGA 800
      F S K F G G S R E S D R H H T N F L A G V F K L E P G

810     820     830     840     850     860     870     880
801  TTCCTCA TCGCAA GTTCCCTTTCTCA GAGA GGA CA CGTGTTTCTTGA TGCA TCTT CGCCCA TAAAAA TTA TATCGGGCT 880
      F L I A S S L S Q R G H V F L D A S S F I K N Y I G L

890     900     910     920     930     940     950     960
881  ATA TAA GTTA TAGCTA CCA GA TA CAA TAGTTGAAA CTGAA A TGA TTTGA TA CTGA GA GTA CA CTA GCTGTGTA A TGCCA 960
      Y K L

970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
961  GTTGA TAA TATTTCTTTA CAGA CCGA TCGAA GA TCA GAA CA CTAA GA TGTA A A TCA TTTTGTCAA A CA GTGA TTTTCTC 1040

1050    1060    1070    1080    1090
1041  CTCTTTCAA CA GAA TTGCA GAGGGA TA CAA TA CGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA 1097

```

Fig. 2

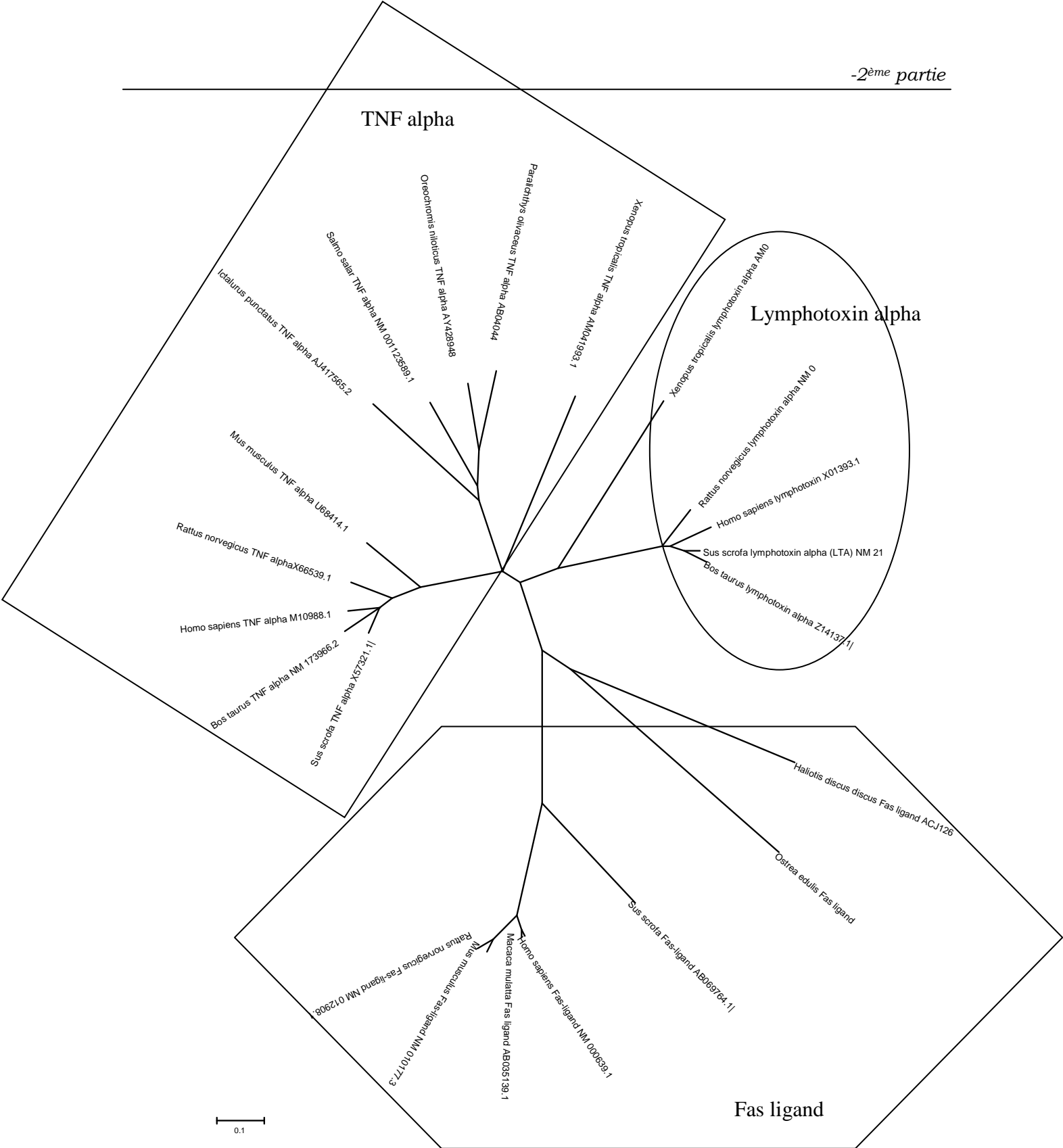


Fig. 3

| | | Identity | Similarity |
|-------------|---|----------|------------|
| OeIAP-BIR | R I A S Y N N W P P T A K Q N P Q N L A D A G F F Y T G D A D S V R C F I C G T G L R N - - W D P E D E P W V E H A R W A P E C F Y V K | | |
| HalvIn-BIR | R L A S F Y D W P L T A E V P P E L L A A G F F T G H Q D K V R C F F C Y G G L Q S - - W K R G D D P W T E H A K W F R S C Q F L L | 51% | 70% |
| PmIAP-BIR1 | R L N T F S - - S S D F V V D K K K F A E A G F Y Y T K K G D D V K C F D C K W E V D A K T I S P A D D I A R I H K E R R P D C P F A Q | 25% | 48% |
| DmIAP1-BIR1 | R L K T F T D W P L D W L D K R Q - L A Q T G M Y F T H A G D K V K C F F C G V E I G C - - W E Q E D C P V R E H Q R W S P N C P L L R | 36% | 66% |
| DmIAP2-BIR1 | R L A T F G E W P L A R V S A E D L V A N G F F T G N W L E A E C H F C H V R I D R - - W E Y G C Q V A E R H R R S S P I C S M V L | 30% | 48% |
| OeIAP-BIR | R I A S Y N N W P P T A K Q N P Q N L A D A G F F Y T G D A D S V R C F I C G T G L R N W D P E D E P W V E H A R W A P E C F Y V K | | |
| HalvIn-BIR | R L A S F Y D W P L T A E V P P E L L A A G F F T G H Q D K V R C F F C Y G G L Q S W K R G D D P W T E H A K W F P S C Q F L L | 51% | 70% |
| PmIAP-BIR2 | R L E T F I D W P - V K W L D P S E L A S G F F Y L R T A D H C A C V F C R G I Y G A W E V G D T P R G E H Q R F F P H C F F I R | 31% | 50% |
| DmIAP1-BIR2 | R L R T F E A W P R N L K Q K P H Q L A E A G F F Y T G V G D R V R C F S C G G G L M C W N D N D E P W E C H A L W L S Q C R F V K | 53% | 74% |
| DmIAP2-BIR2 | R L V T F K D W P - N P N I T P C A L A A G F F Y L N R L D H V K C V M G N G I A H W E K N D N A F E E H K R F F Q C P R V G | 34% | 61% |
| OeIAP-BIR | R I A S Y N N W P P T A K Q N P Q N L A D A G F F Y T G D A D S V R C F I C G T G L R N W D P E D E P W V E H A R W A P E C F Y V K | | |
| HalvIn-BIR | R L A S F Y D W P L T A E V P P E L L A A G F F T G H Q D K V R C F F C Y G G L Q S W K R G D D P W T E H A K W F P S C Q F L L | 51% | 70% |
| PmIAP-BIR3 | R L A S F Y D W P E R V T Q I P S D L A D A G F F Y C G L S D H V R C F H C G N G L R N W E K D I P W N E H A R W Y P E C S Y V L | 62% | 72% |
| DmIAP2-BIR3 | R L R T F T D W P I S N I Q P A S A L A D A G L Y Y Q K I G D C V R C F H C N I G L R S W Q K E D E P W F E H A K W S P R C Q F V L | 46% | 65% |
| OeIAP-RING | C I L G C E E R V S I V F L P C G H L V S C A C C S R A L K N C P I C R | | |
| HalvIn-BIR | C K V C L D R A V S I V F V P C G H L V - C A E C A P G L Q L C P I C R | 61% | 80% |
| PmIAP-RING | C K V C L D A E I D V F L P C H V V T C A S C A V A L T C C P I C R | 50% | 75% |
| DmIAP1-RING | C K I C Y G A E Y N T A F L P C G H V V A C A K C A S S V T K C P L C R | 44% | 69% |
| DmIAP2-RING | C K V C L D E E V G V F L P C G H L A T C N C A P S V A N C P I C R | 58% | 80% |

Fig. 5

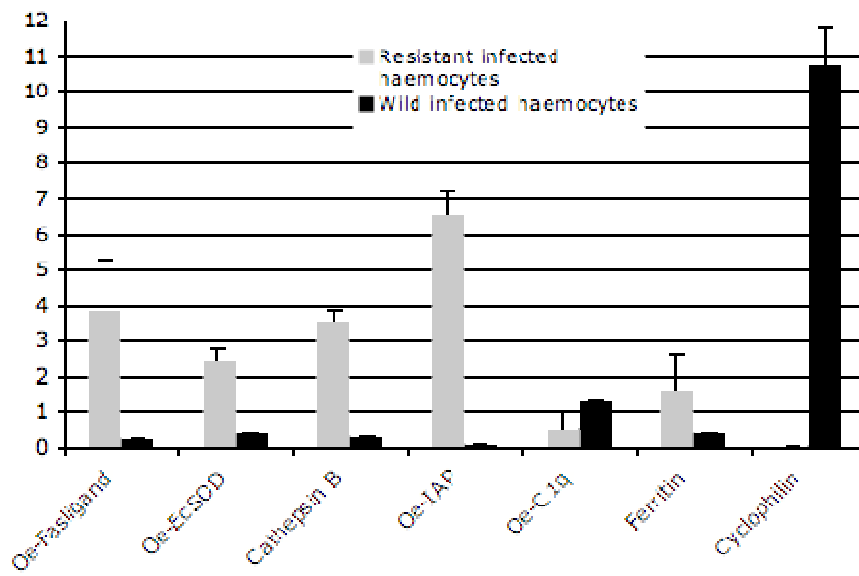


Fig. 6

| Name | Oligonucleotide sequence (5'-3') | Concentration of Forward primer (μ M) | Concentration of Reverse primer (μ M) |
|-------------|---|--|--|
| OelAP | Forward: CTACCTCCCCAGGATTGTCA Reverse: CACCACTCTCCTCCATGTCA | 3 | 3 |
| OeFas | Forward: TTTGGGCAGTGGTGTAAAGTG Reverse: TAGCCCTGTTTCTCCACCAG | 1.5 | 3 |
| Cathep | Forward: CTGCACTGATCTGGGACTCA Reverse: ATTACYGGCTGGTGGCAAAC | 3 | 3 |
| OeEc-SOD | Forward: GAGGAGGAAGAGGACCATCC Reverse: ATTTTCCTCCGCTTTGTGTG | 2.5 | 2.5 |
| Oefer | Forward: GATGTGATCGGACACCTCCT Reverse: TCACAAAGTTGCAGGCAGTC | 3 | 3 |
| OeC1q | Forward: CAGTCCCTCAGAGCCTGTTC Reverse: ACAGGTATACGCCGGTTTTG | 3 | 3 |
| Oepepti | Forward: ATGAGCCAGGTCATCAAAGG Reverse: GGCCTAGGAGTCCACATCA | 3 | 3 |
| ElongPCRQ5m | Forward: GTCGCTCACAGAAGCTGTACC Reverse: CCAGGGTGGTTCAAGATGAT | 3 | 3 |
| TOPO | Forward: GACCATGATTACGCCAAGC Reverse: CCCAGTCACGACGTTG | | |

Table 1: Combinations of primers used in quantitative PCR assays

| | |
|---|------|
| Total clones sequenced | 1920 |
| Sequences analysed | 1831 |
| Total of sequences with significant match | 382 |
| Contigs | 333 |
| Singletons | 606 |
| Redundancy | 48% |
| Average size number pb | 450 |

Table 2 : General characteristics of the subtracted library and cDNA sequences from *Ostrea edulis* haemocyte.

III Identification de gènes de ménage chez *Ostrea edulis* infectée par le parasite *Bonamia ostreae*

L'étude du niveau d'expression des transcrits par PCR en temps réel nécessite l'identification de gènes de ménage ou de contrôles internes visant à normaliser l'étude de l'expression relative.

L'analyse du niveau des transcrits n'ayant jamais été réalisé chez l'huître plate en présence du parasite *Bonamia ostreae*, il était nécessaire de mettre au point une PCR en temps réel intégrant un/des gènes de ménage. Ne disposant pas de données dans les banques publiques. Il a été réalisé un travail préliminaire d'identification d'ESTs potentiellement candidates pour cette étude dans les banques précédemment présentées dans cette partie. La recherche d'ESTs candidates dans les banques soustractives a permis de sélectionner cinq ESTs : les séquences codant le facteur d'élongation 1 alpha (EF1- α), la protéine ribosomique L5, la glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la polyubiquitine (Ubiq) et la β -actine, gènes utilisés dans d'autres modèles comme gènes de ménage. Afin d'analyser la stabilité de l'expression de ces ESTs, il a été réalisé plusieurs essais d'infections *in vitro*. L'expression des ESTs a été quantifiée par PCR en temps réel chez des hémocytes infectés et des hémocytes seuls. La stabilité de l'expression a été analysée par deux approches analytiques *GeNorm* et *NormFinder*.

L'évaluation de la stabilité des gènes de ménage est une étape essentielle dans la mise au point d'une PCR en temps réel dans le but d'étudier le niveau d'expression des gènes cibles en utilisant la méthode des doubles deltas Cts. L'expression de gènes chez les mollusques bivalves est largement étudiée de nos jours, mais seulement deux études intégrant la mise au point de l'utilisation de gènes de ménage ont été réalisées chez *Mya arenaria* (Siah *et al.*, 2008 ; Araya *et al.*, 2008).

L'étude a permis d'identifier deux gènes dont l'expression est stable et comparable entre hémocytes en présence du parasite et hémocytes seuls, le facteur d'élongation alpha (EF1- α) et la glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase

GAPDH. Ces gènes sont utilisés dans de nombreux modèles. En revanche, l'expression des autres gènes s'est révélée instable. Les résultats obtenus permettent de recommander l'utilisation du facteur d'élongation alpha ou GAPDH comme gènes de ménage et de mesurer les niveaux d'expression de gènes d'intérêt. La méthode d'analyse GeNorm conseille l'utilisation de trois gènes de ménage. De plus, ces deux derniers gènes ont été complètement caractérisés par RACE PCR. Le développement de cet outil a été directement appliqué dans l'étude suivante afin d'étudier le niveau d'expression d'ESTs potentiellement impliqués dans les interactions hôte/parasite.

Article n°3 : Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR

(Sous presse Fish & Shellfish Immunology)

Benjamin Morga, Isabelle Arzul*, Nicole Faury, Tristan Renault

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER); Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP); La Tremblade, France

Corresponding author. Mailing address: IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France. Phone: 33 5 46 76 26 10. Fax: 33 5 46 76 26 11. E-mail: iarzul@ifremer.fr

Abstract

Bonamia ostreae is an intrahaemocytic protozoan affecting *Ostrea edulis*. The parasite multiplies within haemocytes without being degraded and involves changes in cellular activities. Studies aiming at better understanding host response to a pathogen at the transcriptome levels are frequently based on the use of real time PCR assays, which require some reference genes. However, very few sequence data is available for *Ostrea edulis* in public databases.

Subtracted cDNA libraries were constructed from the *Ostrea edulis* haemocytes in order to identify genes involved in host reactions against the parasite and quantitative real time PCR assays were developed to study expression of these genes. In this context, identification of reference genes and study of their relative expression stability were required for quantitative real time PCR normalization.

The expression of 5 potential candidate reference genes from *Ostrea edulis* (ie elongation factor 1 alpha (EF1- α), 60S ribosomal protein L5 (L5), glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH), polyubiquitin (Ubiq) and β -actin (ACT)) was studied using RNAs extracted from pools of haemocytes in contact with the parasite *Bonamia ostreae* and haemocytes alone. Gene expression was quantified by real time PCR and expression stability was analysed with two analytical approaches *GeNorm* and *NormFinder*. GAPDH and EF1- α were identified as the most stable genes with the *GeNorm* analysis. Whatever were the tested conditions, EF1- α was also found as the most stable gene using *Normfinder*. The less stable gene was β -actin although this gene is commonly used as housekeeping gene in many studies.

Our results suggest using GAPDH and EF1- α combined as reference genes when studying expression levels in haemocytes of *Ostrea edulis*. In addition, the complete ORF of these two genes was characterized.

Key words: Real time PCR, Housekeeping genes, Haemocytes, *Ostrea edulis*, *Bonamia ostreae*, EF1- α , GAPDH

1. Introduction

The parasite *Bonamia ostreae* was first reported in France in 1979 infecting the European flat oyster, *Ostrea edulis* [1, 2]. Despite 30 years of research on this protozoan pathogen, host parasite interactions are poorly known and few sequence data is available for *O. edulis* in public databases. A recent study has been conducted to investigate the transcriptome during an *in vitro* infection of *O. edulis* haemocytes with purified parasites. cDNA libraries allowed obtaining a large number of expressed sequence tags (ESTs). Based on sequence homologies, some ESTs were selected for expression assays and the quantification of transcription levels in haemocytes was undertaken using quantitative real time PCR.

Quantitative real time PCR is commonly used to study gene expression due to high sensitivity, specificity, reproducibility and broad dynamic range [3-5]. Level of gene expression is determined by quantifying the relative amount of target mRNA between different conditions, using the comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta ct}$), or Pfaffl method including the adjustment by the amplification efficiencies [6]. The relative quantification method requires an internal control or a housekeeping gene. The internal control is an endogenous control that allows correction of experimental variations caused by the quantity and quality of starting material, inhibitory compounds, pipetting errors, biological variability, the reverse transcription efficiency and the experimental design [7]. Reference genes are thus compulsory but they must be carefully validated as pointed out in the MIQE guideline. This guideline suggests a minimum set of information that researcher should provide for their quantitative real time PCR data [8]. The ideal housekeeping gene should present a stable mRNA expression and should be minimally regulated under experimental conditions [9-12].

18S ribosomal RNA, glyceraldehyde-3 phosphate-dehydrogenase and β -actin have frequently been used as reference genes in bivalves [13-15]. These genes are involved in ribosome structure, metabolism and cytoskeleton respectively and their expression level is assumed to be constant. However, some studies have shown that expression of these genes can vary depending on development stages or in response to an external treatment [10, 16]. Relative quantification by real time PCR requires first a study of the suitability and stability of one or more housekeeping genes in selected experimental conditions [17]. Some mathematical methods have been

developed to evaluate relative stability of gene expression in order to identify the most suitable housekeeping genes [18, 19]. Two Visual Basic Applications for Microsoft Excel are currently widely used to determine reference gene suitability: *GeNorm* [18] and *NormFinder* [19]. *GeNorm* is a mathematical method based on the principle that the expression ratio of two ideal control genes should be identical in all samples and experimental conditions. It calculates gene expression stability (M), which is the mean pair-wise variation between an individual gene and all other tested reference genes [18]. *NormFinder* is another Excel applet based on an algorithm for identifying the optimal normalization gene(s) among a set of candidates [19]. It ranks the candidate genes according to their mRNA expression stability value in a given sample set and a given experimental design. This approach combines the intra-group and inter-group expression variation to a stability value that enables the ranking of genes by mRNA expression stability.

In this context, the aim of the present study was to identify from ESTs database previously obtained, optimal reference genes that could be used for expression analysis in flat oyster haemocytes experimentally infected by the parasite *Bonamia ostreae*. The five tested reference genes (Table 1) were housekeeping genes commonly used in quantitative real time PCR studies: elongation factor 1 alpha (EF1- α), 60S ribosomal protein L5 (L5), glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH), polyubiquitin (Ubiq) and the β -actin (ACT) [10, 16, 20]. In addition, the ORF of EF1- α and GAPDH, identified as the most suitable housekeeping genes in our study, were fully characterized.

2. Material and methods

2.1 Biological material

2.1.1 Oysters

Two-year-old flat oysters *Ostrea edulis* were collected from Quiberon Bay (France) in November 2008 and acclimatized in the quarantine facilities of IFREMER laboratory in La Tremblade (Charente-Maritime, France) over 30 days. Flat oysters were maintained in 120 l raceways supplied with a constant flow of seawater enriched in

phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracialis* and *Tetraselmis succica*).

2.1.2 Haemolymph collection

Haemolymph was collected from the adductor muscle sinus of 40 oysters using a 1 ml syringe equipped with a needle (0.40 mm x 90 mm). To eliminate cell aggregates, the haemolymph samples were filtered through 60 µm nylon mesh and held on ice to prevent cell aggregation. Approximately 1 ml of haemolymph was collected from each oyster. Samples were pooled, and haemocytes counted using a Malassez-cell. The haemocyte concentration was adjusted to 1.10^6 cells ml⁻¹ using 0.22 µm filtered seawater (FSW).

2.2 *In vitro* challenge of *Ostrea edulis* haemocytes with *Bonamia ostreae*

Haemocytes (1.10^6 cells ml⁻¹) were incubated with live purified parasites at a ratio of five parasites per one haemocyte for two hours at 15°C. *Bonamia ostreae* was purified according to the protocol developed by Mialhe et al., (1988) [21]. The control consisted of haemocytes alone suspended in FSW (1.10^6 cells ml⁻¹). Four challenges were performed using four different pools of haemolymph, each pool of haemolymph was divided in two parts, one part for the control and a second part for *in vitro* infection. Two hours post challenge, haemocytes were recovered by centrifugation (1500 rcf, 4°C for 15 min).

2.3 Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed in TRIZOL, RNA was separated from DNA and proteins using phenolchloroform. Total RNAs were precipitated using isopropanol. The RNA pellet was washed with 75% ethanol solution and finally eluted in 22 µl. Total RNAs were treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) to remove remaining genomic DNA. The RNA concentration was determined using a spectrophotometer at 260 nm and RNA quality was assessed on a 1% agarose gel.

First strand cDNA was synthesized using the oligo (dT) anchor primer (5'-GAC CACGCGTATCGATGTCGACT(16)V-3') and Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) reverse transcriptase SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

2.4 Real time quantitative PCR

ESTs of five candidate housekeeping genes were obtained from a subtracted cDNA library from *Ostrea edulis*. For each of these genes forward and reverse primers were designed using primer 3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Table 2) and synthesized by Eurogentec. Real time quantitative PCR was carried out in duplicate, all amplification reactions were performed in a total volume of 25 µL using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Stratagene) in 96-microwell plates. Each well (25 µL) contained 5 µL of cDNA dilution (1/30), 12.5 µL of Brilliant® SYBR® Green II PCR Master Mix (Stratagene), 2.5 µL of each diluted primer (3 µM) and 2.5 µL of distilled water. Thermal cycling conditions were: 1 cycle of activation of Hot start Taq polymerase at 95 °C for 10 min; 40 cycles of amplification at 95°C for 10 s, 60°C for 30s; and melting temperature curve analysis at 95°C to 60°C by 0.5°C decrease of the temperature every 10s. In all cases, negative controls (without cDNA) were included to rule out DNA contamination.

For each candidate housekeeping gene, melting curve, gel picture and sequences were analysed in order to verify the specificity of the amplified products and that at a single PCR product was amplified. Efficacy (E) was calculated for each primer pair by determining the slopes of standard curves. Efficacies were calculated according to the following equation $E=10^{(1-slope)}$ [6].

2.5 Rapid amplification of cDNA ends and sequence analysis

In order to obtain the complete open reading frame (ORF) of EF1-α and GAPDH, RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) reactions were carried out using SMART RACE cDNA Amplification Kit from Clontech according to the manufacturer's instructions. 5' and 3' primers were designed using primer 3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (3'elongrace

GTAATCAAGAGCGGAGATGC, 5'elongrace GTCCAATAAATGACCTGCTGTGGTC and 3'GAPDHrace GCAATGCTTCGTGCACCACTAACTGT, 5'GAPDHrace GCGGTGTATGCATGAACCGTTGTC) and synthesized by Eurogentec. After ligation and cloning in TOPO Vector System (Invitrogen) and transformation in Top 10 competent bacteria (Invitrogen), several clones were sequenced from both ends with TOPO forward and reverse primers using BigDye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and an automated DNA sequencer ABI 3130 XL.

Chromatograms were analyzed with Chromas 231 software (Technelysium). NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) was used for detection of known orthologs and for comparison of the obtained cDNAs and deduced polypeptides.

2.6 Phylogenetic analysis of EF1- α and GAPDH

The sequence of the complete ORF of EF1- α was aligned with homologous genes from GenBank database (*Mus musculus* (L26479.1), *Homo sapiens* (AY043301.1), *Bos taurus* (XM001254483.2), *Salmo salar* (BT059777.1), *Solea senegalensis* (AB326302.1), *Sparus aurata* (AF184170), *Mytilus galloprovincialis* (AB162021.1), *Crassostrea gigas* (AB122066.1), *Strongylocentrotus purpuratus* (XM 0011764), *Danio rerio* (NM 131263.1), *Argopecten purpuratus* (ES469321), *Pecten maximus* (DN794050) and *Chlamys farreri* (DT716075).

The sequence of the complete ORF of GAPDH was aligned with homologous genes from GenBank database (*Homo sapiens* (NP002037.2), *Mus musculus* (NP032110.1), *Bos taurus* (NP001029206.1), *Sparus aurata* (ABG23666.1), *Xenopus laevis* (NP001080567.1), *Crassostrea gigas* (ABU84874.1), *Crassostrea virginica* (CAD677717.1) and *Tribolium castaneum* (XP974943.2).

Alignments were performed using the Clustal W [22] including in MEGA 4 [23]. Phylogenetic trees based on amino acid sequences were performed using the Neighbour-Joining [24] algorithm with the MEGA 4 software program. Statistical confidence on the inferred phylogenetic relationships was assessed by bootstrap of 1000 replicates.

2.7 Statistical analysis

Cts were calculated with the stratagene Mxpro software 4.0. Data obtained for each experiment was analyzed using two excel applets, *GeNorm* [18] and *NormFinder* [19].

GeNorm was used to calculate the gene expression normalization factor and to determine the most stable internal controls. Determining the average pairwise variation of a particular gene with all other genes assessed the gene stability measurement M. Moreover, the optimal number of housekeeping genes required for normalization was determined using *GeNorm*. Inter-group and intra-group variations were determined using *NormFinder* and allowed ranking and estimating reference gene stability.

3. Results

3.1 Real time PCR amplification of candidate housekeeping genes

The relative expression level of five candidate housekeeping genes (L5, Ubiq, ACT, GAPDH and EF1- α) was studied during four different *in vitro* infections of haemocytes with the parasite *Bonamia ostreae*. Ct values were distributed between 16.1 (\pm 1.5) for ACT and 21 (\pm 1.2) for GAPDH. Ct value between replicates was less than one. Standard curves exhibited correlation coefficient (R^2) higher than 0.99 and PCR efficiencies ranged from 95% to 100% (Table 3). The amplification specificity was confirmed by melting curve analysis (Fig 1). The melting curves for all genes demonstrated a single peak confirming gene-specific amplification. Agarose gel analyses showed a single band for all amplified genes (data not shown).

3.2 Expression stability of candidate housekeeping genes

Expression stability (M) of each candidate housekeeping gene through different tested RNA samples was calculated using the *GeNorm* program. A low M value translates a highly stable expression in the tested conditions. The rank of the candidate housekeeping genes based on their M values is shown in Fig 2a. ACT

(M=0.516) Ubiq (M=0.469) and L5 (M=0.451) appeared less stable while, GAPDH (M=0.187) and EF1- α (M=0.187) were the most stable genes. The best combination of two genes appeared as GAPDH and EF1- α (M=0.187).

Gene expression stability was also evaluated using another software, *NormFinder*. Stability values for the tested genes from the least to the most stable were: ACT (M=0.130), Ubiq (M=0.119), L5 (M=0.112), GAPDH (M=0.049) and EF1- α (M=0.046) (Fig 2b). The best combination for the most stable was GAPDH and EF1- α (0.034).

3.3 Optimum number of housekeeping genes

In addition, *GeNorm* method can determine the optimum number of housekeeping genes recommended in an experiment using a pairwise number variation $V_n/n+1$ analysis (Fig 3), Vandesompele et al., (2002) [18] proposed 0.15 as a cut-off value, below which the inclusion of an additional reference gene is not required. In our experiment the $V_{2/3}$ and $V_{3/4}$ values were 0.192 and 0.112, respectively suggesting that the normalization factor should preferably contain 3 housekeeping genes.

3.4 Characterization of *Ostrea edulis* EF1- α

ESTs with high similarity to EF1- α have been identified in subtracted cDNA libraries. RACE reactions allowed obtaining the full cDNA of *Ostrea edulis* EF1- α . The length of the EF1- α was 1698 nucleotides (nt). Complete sequence was deposited in GenBank and assigned under the accession number EU651798. The sequence contained a short 5'-untranslated region (1-57 nt) followed by the ORF of 1385 nt (461 codons: 58-1443 nt) and finished by an 3'-untranslated region (1444-1698 nt) (Fig 4). The ORF included three domains: elongation factor I 82-768 nt, elongation factor II 778-1050 nt and elongation factor III 1057-1368 nt (Fig 5).

The ORF of the EF1- α presented characteristic regions G1 to G4 critical in GDP/GTP exchange, GTP-induced conformational change and GTP hydrolysis (Fig 5). The amino acid sequence was submitted in PROSITE database (<http://www.expasy.ch/prosite/>) and a conserved motif DKLKAERERGITIDIA was identified at position 61 to 76. This motif is a signature of the GTP-binding elongation factor (Fig 5).

The nucleotide sequence of EF1- α from *Ostrea edulis* presented 73% to 86% of identity with other species. *Crassostrea gigas* presented the highest percentage of identity (86%).

The alignment of the selected amino acid EF1- α sequences and phylogenetic tree showed that *Ostrea edulis* EF1- α clustered with other invertebrate EF1- α (Fig 6).

3.5 Characterization of *Ostrea edulis* GAPDH

Ostrea edulis cDNA GAPDH showed a 1309 nucleotide (nt) sequence. Complete sequence was deposited in GenBank and assigned under the accession number GQ150762. The sequence contained a short 5'-untranslated region (1-70 nt) followed by an ORF of 1008 nt (335 codons: 69-1077 nt) and finished by a 3'-untranslated region (1078-1309 nt) (Fig 7). The complete ORF had a putative molecular mass at 36 143.34 Da and a predicted isoelectric point at 7.58. The analysis of the ORF revealed the presence of two domains, NAD binding domain (3-150 aa) and C terminal domain (155-312) (Fig. 7). ORF of GAPDH had a typical eukaryotic GAPDH signature (ASCTTNCL; positions from 148 to 155) [25].

The nucleotide sequence of GAPDH from *Ostrea edulis* presented 74% to 91% of identity with other species. *Crassostrea gigas* presented the highest percentage of identity (91%).

The phylogenetic tree based on amino acid sequences of GAPDH from different species showed that *Ostrea edulis* GAPDH belong to the "mollusc cluster" with *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* (Fig 8).

4. Discussion

The quantitative real time PCR is a powerful tool to measure gene expression [6]. This method requires an internal control (ie reference gene or housekeeping gene) in order to normalize gene expression and to integrate experimental variations. The expression of housekeeping genes must be stable during the experiment. Thus, studying the expression stability of housekeeping genes is recommended before quantifying genes of interest by quantitative real time PCR [8, 17].

In our study, five candidate housekeeping genes identified from subtracted libraries have been selected and expression monitored by real-time quantitative PCR during *in vitro* infections of *Ostrea edulis* haemocytes with the parasite *Bonamia ostreae* to check their stability. Selected housekeeping genes are involved in ribosomal metabolism (L5), cytoskeleton structure (ACT), protein metabolism (Ubiq and GAPDH) and elongation process (EF1- α).

Two different analytical approaches based on *GeNorm* and *NormFinder* algorithms were used to identify the most suitable housekeeping genes. Their expression was compared between exposed and non-exposed haemocytes during an *in vitro* infection of *Ostrea edulis* cells with the parasite *Bonamia ostreae*. *GeNorm* and *NormFinder* allowed ranking candidate housekeeping genes according to their expression stability.

Both approaches gave concordant results. EF1- α and GAPDH genes appeared as the most suitable housekeeping genes in the present experiment. Both genes are widely used as housekeeping genes. EF1- α is a member of the G protein family, and one of the four subunits that compose the eukaryotic elongation factor 1 [26, 27]. EF1- α plays a key role in protein translation. Araya et al., (2008) [10] demonstrated that EF-1 α is a suitable reference gene during an *in vitro* challenge of *Mya arenaria* haemocytes with *Vibrio splendidus*. In Atlantic salmon, EF1- α was identified as the most stable gene in both healthy and virus infected tissues [28]. This gene was also reported as the best housekeeping gene during the larval development of the flatfish *Solea senegalensis* [29] and during the development of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* [30].

The GAPDH gene is frequently used as a housekeeping gene in human [31] or in plants [32]. Although the expression of this gene appeared stable in our experiment, it was shown unsuitable in other studies because of its involvement in different functions. GAPDH is implicated in nuclear RNA export, DNA replication, DNA repair, exocytotic membrane fusion, cytoskeleton organisation and phosphotransferase activity [33]. Moreover, Cho et al., (2008) [34] showed that the expression of 2 GAPDH isoforms from the marine teleost fish *Oplegnathus fasciatus* was modulated in response to bacterial and viral infections.

The less stable genes identified in the present study were Ubiq and ACT.

Ubiq has previously been used as housekeeping gene in the study of *Mya arenaria* responses to infection with *Vibrio splendidus* [10]. However, in our study, the

expression of this gene was found unstable between the tested conditions. This instability could be explained by the involvement of polyubiquitin in protein degradation through the proteasome. Although β -actin is commonly used as housekeeping genes in quantitative real time PCR assays, our results suggest that the parasite *Bonamia ostreae* affects the expression of ACT. β -actin is involved in the cytoskeleton structure which plays a pivotal role in the phagocytosis and encapsulation. Intracellular parasites such as apicomplexan parasites require polymerisation of host actin in order to penetrate into host cells [35]. A similar mechanism might be developed by the parasite *Bonamia ostreae*. Chagot et al., 1992 [36] demonstrated that parasites were not engulfed when haemocytes were treated with cytochalasin B prior parasite contact. These results support an active participation of host cells in the internalisation of the parasite.

The *GeNorm* analysis also defined the optimal number of housekeeping genes in the present study as 3. Vandesompele et al., (2002) [18] suggested that in most cases three housekeeping genes is the optimal number for a valid normalization strategy. The molecular characterization of the EF1- α and GAPDH in *Ostrea edulis* allowed studying the sequence of the gene and identifying conserved domains and signatures present in other species. The phylogenetic analysis assigned the flat oyster EF1- α and GAPDH inside the mollusc clusters.

This study is the first, to our knowledge, that describes the evaluation of flat oyster genes as housekeeping genes for real time quantitative PCR. The most appropriate housekeeping gene in flat oyster haemocytes is the EF1- α . In this respect it is now possible to evaluate the level of expression of genes of interest in order to improve the knowledge on interactions between the flat oyster and the parasite *Bonamia ostreae*. This study has also shown the importance to determine statistically the stability of references genes in every experiment because of the impact of the experimental conditions used on gene expression.

Acknowledgement

The authors are very grateful to anonymous reviewers for revising the manuscript. The Région of Poitou Charentes supported in part this research. The authors thank Raphael Brizard for technical assistance for the maintenance of oysters in IFREMER La Tremblade quarantine facilities.

References

- [1] Pichot Y, Comps M, Tige G, Grizel H, Rabouin MA. Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) Rev Trav Inst Pêches Marit 1979; 43: 131-140.
- [2] Comps M, Tige G, Grizel H. Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* (L.). C. R. Acad Science Paris 1980 ; 290:383-385.
- [3] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 2006; 27:95-125.
- [4] Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. J Mol Endocrinol 2005; 34:597-601.
- [5] Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. J Biomol Tech 2004; 15:155-166.
- [6] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acid Res 2001; 29: 2002-2007.
- [7] Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques 2004; 37:112-119.
- [8] Bustin SA. Why the need for qPCR publication guidelines? -The case for MIQE. Method 2010; 50: 217-226.
- [9] Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J Exp Bot 2005; 56: 2907-2914.
- [10] Araya M.T, Siah A, Mateo D, Markham F, McKenna P, Johnson G et al. Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. J Invertebr Pathol 2008; 99: 326-331.
- [11] De Boer ME, De Boer T, Mariën J, Timmermans MJ, Nota B, Van Straalen NM et al. Reference genes for QRT-PCR tested under various stress conditions in *Folsomia candida* and *Orchesella cincta* (Insecta, Collembola). BMC Mol Biol 2009; 10:54.
- [12] Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E and Ciaffi M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Mol Biol 2009; 10:11.
- [13] Huvet A, Daniela JY, Quéré C, Dubois S, Prudence M, Van Wormhoudt et al. Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. Aquaculture 2003; 228:321-333.
- [14] Veldhoen N, Loweb CJ, Davis C, Mazumder A, Helbing CC. Gene expression profiling in the deep water horse mussel *Modiolus modiolus* (L.) located near a marine municipal wastewater outfall. Aquatic Toxicology 2009; 93:116-124.
- [15] Dondero F, Dagnino A, Jonsson H, Capri F, Gastaldi L, Viarengo A. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. Aquatic Toxicology 2006; 78S:S13-S24.
- [16] Olsvik PA, Lie KK, Jordal AEO, Nilsen TO, Hordvik I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. BMC Mol Biol 2005; 6:21.
- [17] Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. Anal Biochem 2005; 344:141-143.
- [18] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002; 3:RESEARCH0034.
- [19] Andersen CL, Jensen JL, Orntoff TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 2004; 64:5245-5250.
- [20] Siah A, Dohoo C, McKenna P, Delaporte M, Berthe, FCJ. Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*. Fish Shellfish Immunol 2008; 25:202-207.

- [21] Mialhe E, Bachere E, Chagot D, Grizel H. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture* 1988; 71:293-299.
- [22] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 24:4876-4882.
- [23] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24:1596-1599.
- [24] Saitou N & Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; 4:406-425.
- [25] Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1432:159-84.
- [26] Browne GJ, Proud CG. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem* 2002; 269:5360-5368.
- [27] Ejiri S. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66:1-21.
- [28] Jorgensen SM, Kleveland EJ, Grimholt U, Gjoen, T. Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon. *Mar. Biotechnol* 2006; 8: 398-408.
- [29] Infante C, Matsuoka MP, Asensio E, Cañavate JP, Reith M, Manchado M. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2008; 9:28.
- [30] Mitter K, Kotoulas G, Magoulas A, Mulero V, Sepulcre P, Figueras A, Novoa B, Sarropoulou E. Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2009; 4: 340-347.
- [31] Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, and Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 21: 389-395.
- [32] Barsalobres-Cavallari CF, Severino FE, Maluf MP and Maia IG. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Mol Biol* 2009; 10:1
- [33] Bustin, SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29: 23-39.
- [34] Cho YS, Lee SY, Kim KH, Nam YK. Differential modulations of two glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase mRNAs in response to bacterial and viral challenges in a marine teleost *Oplegnathus fasciatus* (Perciformes). *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25: 472-476.
- [35] Gonzalez V, Combe A, David V, Malmquist NA, Delorme V, Leroy C et al. Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerisation in the host cell. *Cell Host & Microbe* 2009; 5:259-272.
- [36] Chagot D, Boulo V, Hervio D, Mialhe E, Bachere E, Mourton C et al. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *J Invertebr Pathol* 1992; 5: 241-249.

Figure captions

Figure 1 Dissociation curves of (A) ACT, (B) EF1- α , (C) GAPDH, (D) L5 and (E) Ubiq.

Figure 2 Determination of the most stable gene during an *in-vitro* infection of haemocytes from flat oyster *Ostrea edulis* with parasites *Bonamia ostreae* using the *GeNorm* and *NormFinder* methods. (a) Average expression stability value M of the five candidate reference genes using *GeNorm*. (b) Stability index of the five candidate reference genes using *NormFinder*.

Figure 3 Determination of the optimal number of housekeeping genes required for accurate normalization based on pairwise variation (V_n/V_{n+1}) between candidate genes using *GeNorm* analysis.

Figure 4 Complete ORF nucleotide and deduced amino acid sequences of the flat oyster EF1- α . ORF contains three domains: elongation factor I (82-768 nt) in red, elongation factor II (778-1050 nt) in green and elongation factor III (1057-1368 nt) in blue. Start and stop codons are highlighted in grey.

Figure 5 Comparison of the EF1- α amino acid sequences of *Ostrea edulis* and three other species (*Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* and *Homo sapiens*). Dots represent identity of amino acid between species and dashes represent gaps. G1 to G4 indicate the critical regions involved in GDP/GTP exchange and GTP hydrolysis. The consensus sequence composed of the three consensus elements GXXXXGK (G¹⁴-K²⁰), DXXG (D⁹¹-G⁹⁴), and NKXD (N¹⁵³-D¹⁵⁶) present in the GTP-binding domain is shaded in grey. The GTP-binding elongation factor signature corresponding to amino acids 61 to 76 is boxed.

Figure 6 Un-rooted phylogenetic tree on the selected EF1- α amino acid sequences. The tree was constructed using the neighbour-joining algorithm in the Mega 4.0 program. Bootstrap values (shown) are based on 1 000 resamplings of the data. The scale for branch length (0.05 substitutions/site) is shown below the tree.

Figure 7 Comparison of the GAPDH amino acid sequences of *Ostrea edulis* and three other species (*Crassostrea gigas*, *Sparus aurata* and *Homo sapiens*). Dots represent identity of amino acid between species and dashes represent gaps. The NAD binding domain (3-150 aa) is underlined in black and the C terminal domain (155-312) is underlined in red. The typical eukaryotic GAPDH signature (ASCTTNCL) corresponding to amino acids 148 to 155 is boxed.

Figure 8 Un-rooted phylogenetic tree on the selected GAPDH amino acid sequences. The tree was constructed using the neighbour-joining algorithm in the Mega 4.0 program. Bootstrap values (shown) are based on 1 000 resamplings of the data. The scale for branch length (0.05 substitutions/site) is shown below the tree.

Fig. 1

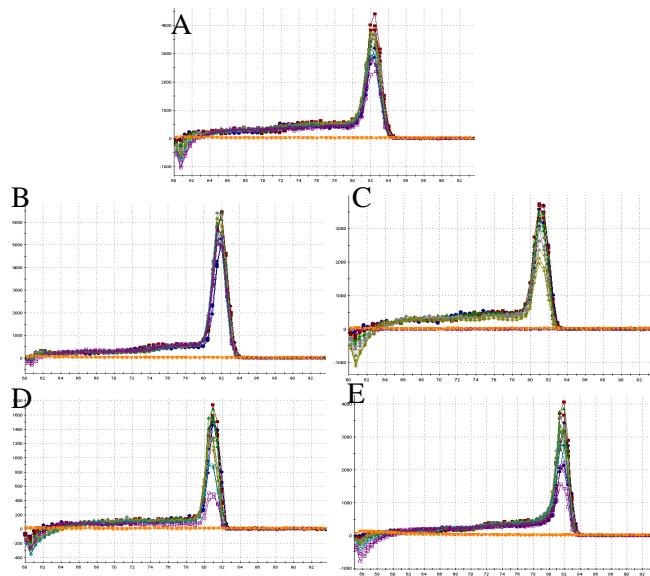


Fig. 2

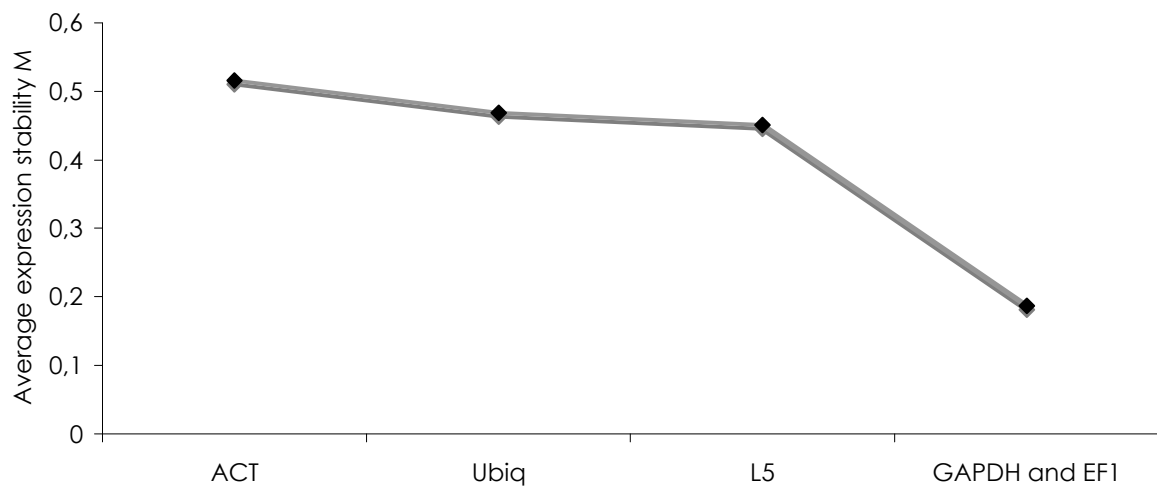


Fig. 2a

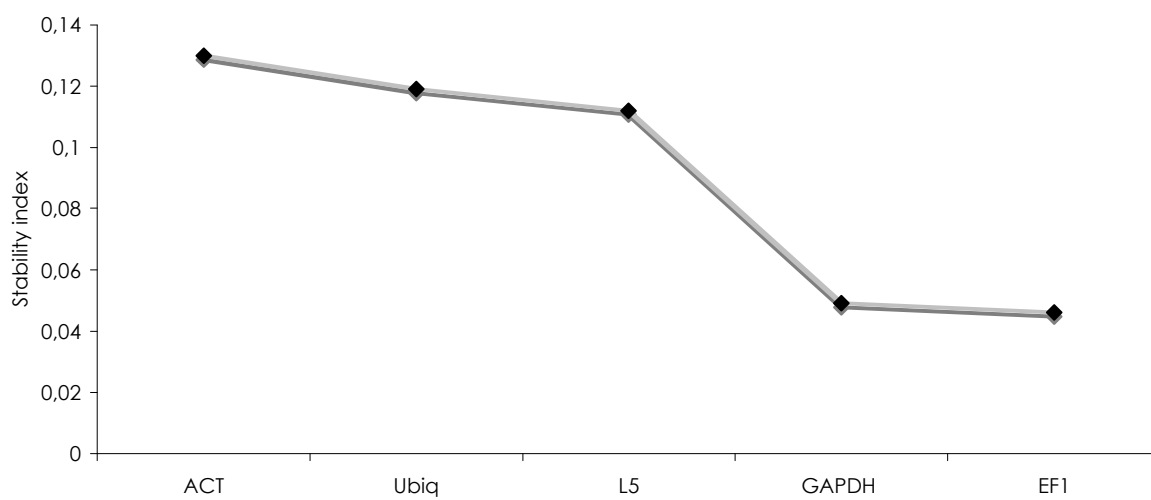


Fig. 2b

Fig. 3

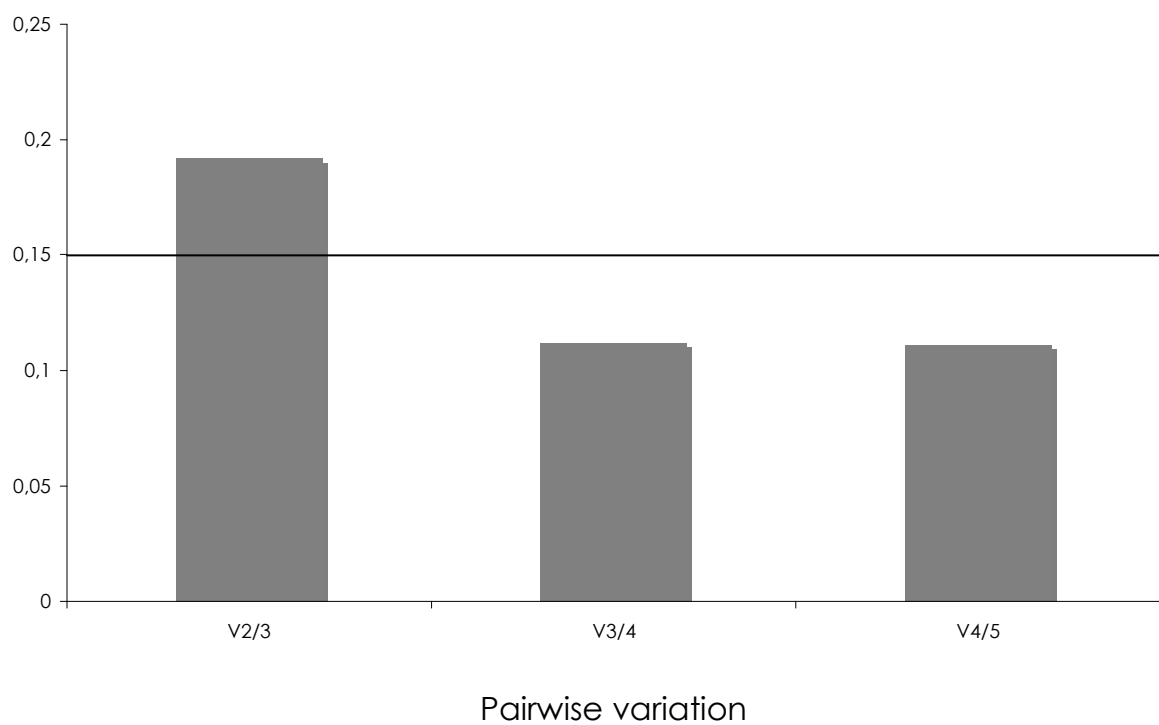


Fig. 4

| | | |
|------|---|------|
| 1 | GCC TTT TTG CTG TGG CTG ACT CTG GGA TAT CAA GAG TAT TAA ATA | 45 |
| 1 | | 15 |
| 46 | CTA GGA GCA ACG ATG GTT AAA GAA AAG ATT CAC ATC AAC ATT GTC | 90 |
| 16 | M V K E K I H I N I V | 30 |
| 91 | GTC ATT GGT CAT GTC GAC TCT GGA AAA TCG ACC ACT ACT GGA CAT | 135 |
| 31 | V I G H V D S G K S T T T G H | 45 |
| 136 | CTT ATC TAC AAA TGT GGT GGA ATT GAC GAG AGA ACC ATT GCC AAG | 180 |
| 46 | L I Y K C G G I D E R T I A K | 60 |
| 181 | TTT GAA AAG GAA GCT GCT GAG ATG GGC AAG GGT TCC TTC AAG TAC | 225 |
| 61 | F E K E A A E M G K G S F K Y | 75 |
| 226 | GCC TGG GTG TTG GAC AAA CTG AAG GCT GAG CGT GAA CGT GGA ATC | 270 |
| 76 | A W V L D K L K A E R E R G I | 90 |
| 271 | ACC ATT GAC ATT GCC CTC TGG AAG TTT GAG ACG GCA AAG TAC CAC | 315 |
| 91 | T I D I A L W K F E T A K Y H | 105 |
| 316 | ATC ACA ATT ATT GAT GCT CCA GGC CAC AGA GAT TTC ATC AAA AAC | 360 |
| 106 | I T I I D A P G H R D F I K N | 120 |
| 361 | ATG ATT ACA GGA ACA TCT CAG GCT GAT TGT GCT GTG TTG ATC GTA | 405 |
| 121 | M I T G T S Q A D C A V L I V | 135 |
| 406 | GCA GCA GGT GTT GGG GAA TTT GAA GCA GGT ATC TCC GCC AAT GGA | 450 |
| 136 | A A G V G E F E A G I S A N G | 150 |
| 451 | CAA ACT CGT GAG CAC GCT CTA TTG GCT TTC ACC TTG GGA GTC AAA | 495 |
| 151 | Q T R E H A L L A F T L G V K | 165 |
| 496 | CAG CTC ATT GTC GGA GTC AAC AAA ATG GAC AGC ACG GAA AAA CCA | 540 |
| 166 | Q L I V G V N K M D S T E K P | 180 |
| 541 | TAC AGT GAG ACA CGT TTT GAG AAT ATC AAA GGG GAG GTG GAG AAG | 585 |
| 181 | Y S E T R F E N I K G E V E K | 195 |
| 586 | TAC ATC AAG AAG ATT GGA TAT AAT CCA AAG ACT GTT GCC TTT GTA | 630 |
| 196 | Y I K K I G Y N P K T V A F V | 210 |
| 631 | CCT ATC TCT GGT TGG CAT GGT GAC AAC ATG ATT GAA CAG TCA AAA | 675 |
| 211 | P I S G W H G D N M I E Q S K | 225 |
| 676 | AAT ATG TCT TGG TTC AGG GGT TGG AAT GTG GAG AGG AAA GAA GGA | 720 |
| 226 | N M S W F R G W N V E R K E G | 240 |
| 721 | AAT GCC AGC GGA TTT ACT CTC TTG CAA GCT TTG GAT TCC ATC CTG | 765 |
| 241 | N A S G F T L L Q A L D S I L | 255 |
| 766 | CCA CCA AAG AGA CCC ACA GAT TTG GCC CTT CGT CTT CCT CTG CAG | 810 |
| 256 | P P K R P T D L A L R L P L Q | 270 |
| 811 | GAT GTA TAC AAA ATT GGA GGT ATT GGA ACT GTG CCA GTA GGA AGA | 855 |
| 271 | D V Y K I G G I G T V P V G R | 285 |
| 856 | GTT GAA ACT GGT ATT ATG AAG CCT GGT ATG GTT ATC ACC TTC GCT | 900 |
| 286 | V E T G I M K P G M V I T F A | 300 |
| 901 | CCA CCC AAC ATC ACC ACT GAG GTC AAA TCA GTG GAA ATG CAT CAC | 945 |
| 301 | P P N I T T E V K S V E M H H | 315 |
| 946 | GAG TCG CTC ACA GAA GCT GTA CCA GGA GAC AAT GTT GGC TTC AAT | 990 |
| 316 | E S L T E A V P G D N V G F N | 330 |
| 991 | ATA AAG AAC GTG TCT GTT AAG GAA ATC CGT CGA GGA AAT GTC TGT | 1035 |
| 331 | I K N V S V K E I R R G N V C | 345 |
| 1036 | GGA GAC AGC AAG AAT GAC CCT CCC AAG GGT GCC AAG AAC TTT ATT | 1080 |
| 346 | G D S K N D P P K G A K N F I | 360 |
| 1081 | GCC CAG GTC ATC ATC TTG AAC CAC CCT GGT GAA ATC AAG AAT GGA | 1125 |
| 361 | A Q V I I L N H P G E I K N G | 375 |

| | | |
|------|---|------|
| 1126 | TAT GCG CCT GTC CTC GAT TGC CAC ACT GCT CAT ATT GCC TGC AAA | 1170 |
| 376 | Y A P V L D C H T A H I A C K | 390 |
| 1171 | TTT GTC GAA ATC AGA GAG AAA TGC GAT CGT CGT AGT GGA AAA GTT | 1215 |
| 391 | F V E I R E K C D R R S G K V | 405 |
| 1216 | TTG GAA GAA GCC CCT AAA GTA ATC AAG AGC GGA GAT GCT GCT ATG | 1260 |
| 406 | L E E A P K V I K S G D A A M | 420 |
| 1261 | GTC CTC ATG GTG CCC AGC AAC CCA ATG TGT GTT GAA CAA TTC TCT | 1305 |
| 421 | V L M V P S N P M C V E Q F S | 435 |
| 1306 | AAG TAC GCA CCA TTG GGA CGT TTT GCT GTC CGT GAC ATG AGG CAA | 1350 |
| 436 | K Y A P L G R F A V R D M R Q | 450 |
| 1351 | ACT GTA GCT GTT GGT GTC | 1395 |
| 451 | T V A V G V I K E V E K N E P | 465 |
| 1396 | AGT CAA GGC AAA GTG ACC AAG GCT GCT CAG AAG GCT GGA AAG AAG | 1440 |
| 466 | S Q G K V T K A A Q K A G K K | 480 |
| 1441 | TGA AAA TTA ATG AAC TTT GGA ACC CTT CAA TCC CAT CAG CTT AAT | 1485 |
| 481 | * | 495 |
| 1486 | TAT GAT TTT TAT TTA AAG AGA AAT AAT GAC ATC ATG CCA CTA TTT | 1530 |
| 496 | | 510 |
| 1531 | AAT TTT GAA AGA CCA CAG CAG GTC ATT TAT TGG ACA ATT TGG TTT | 1575 |
| 511 | | 525 |
| 1576 | TTG AAG AAA AAT ATC CAT CGC AAA GAA GTC CGT CGG AAA AAA CGG | 1620 |
| 526 | | 540 |
| 1621 | ATT TGA AGT AGC AAG TAC TTG AAT TAT GTC GAA TAA ATT TGG ACA | 1665 |
| 541 | | 555 |
| 1666 | TTT TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA | 1698 |
| 556 | | |

Fig.5

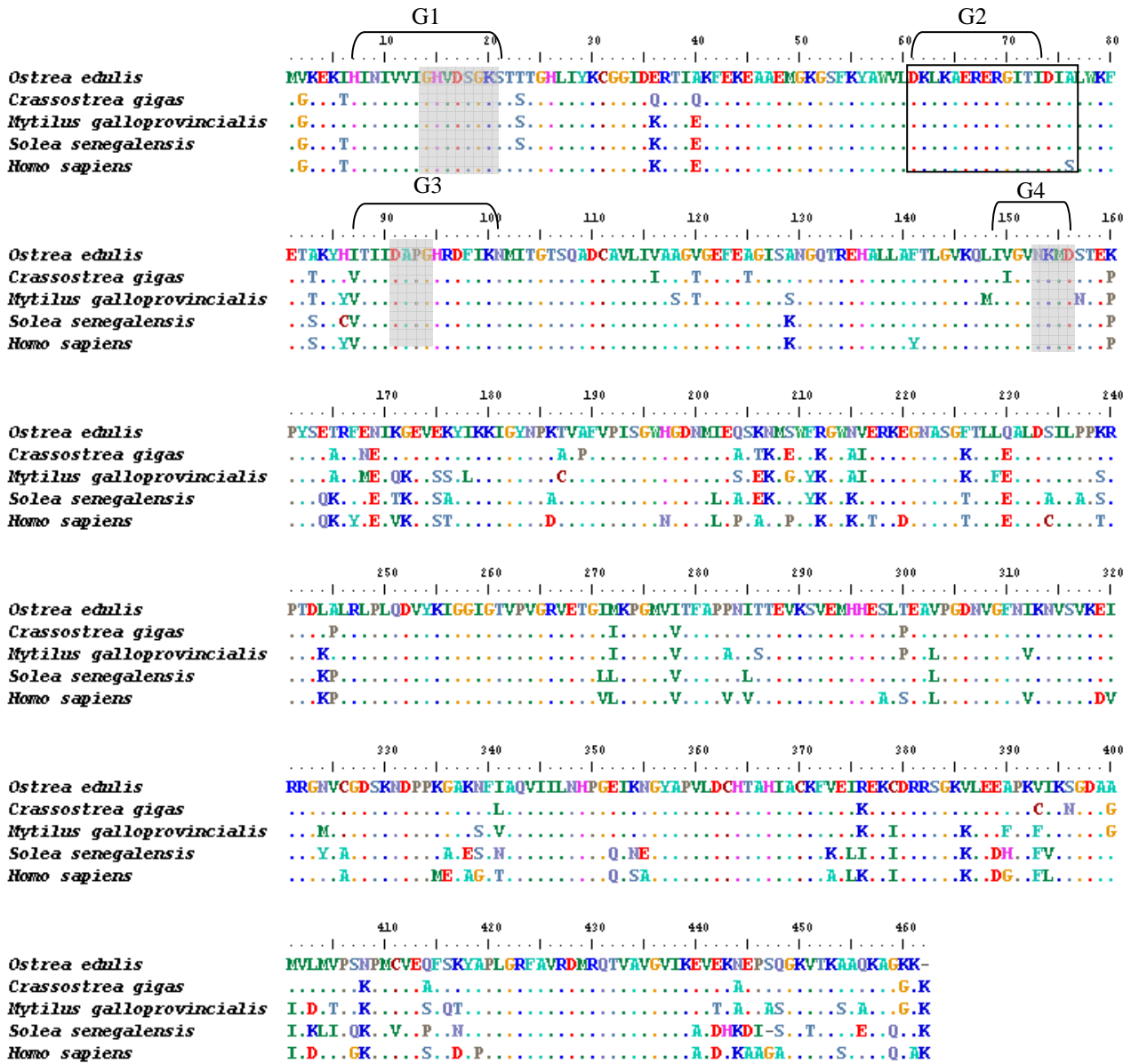


Fig. 6

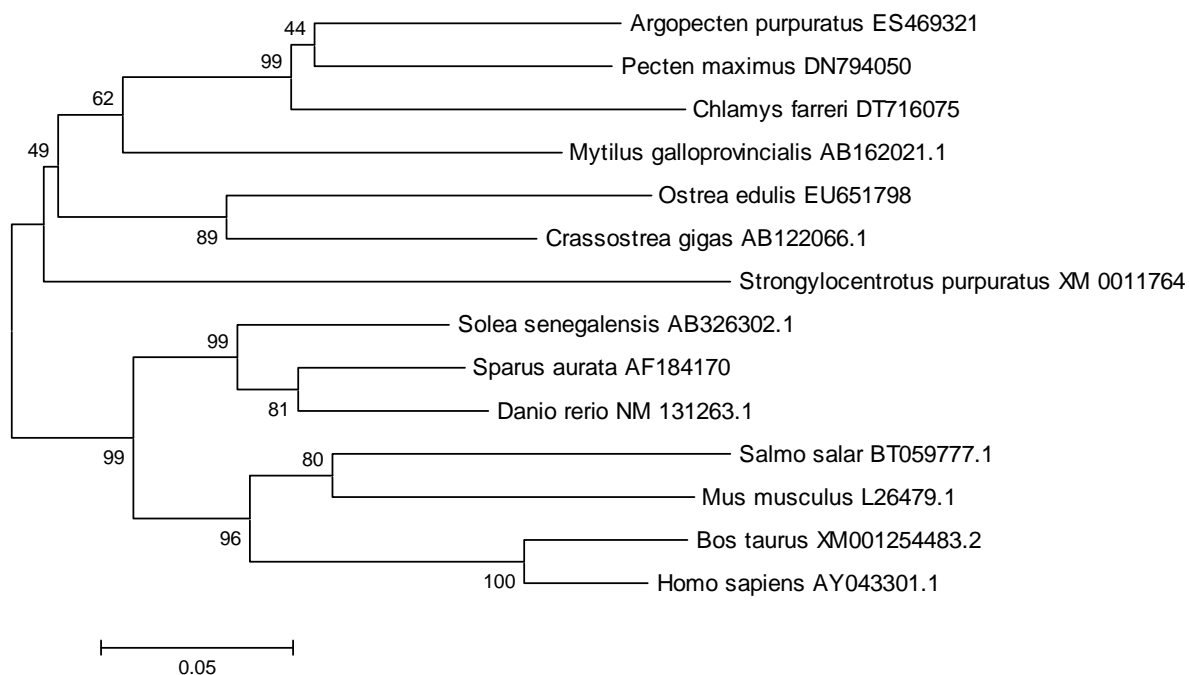


Fig. 7

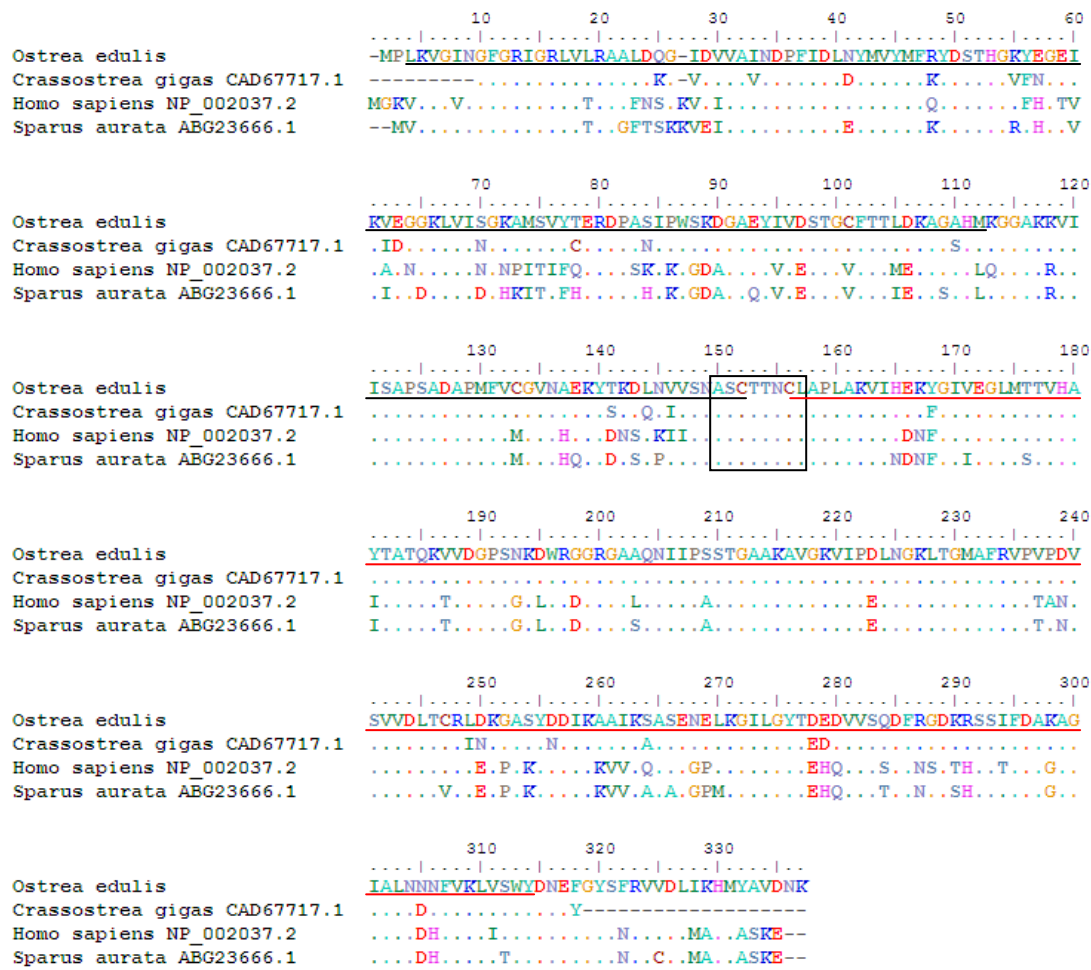
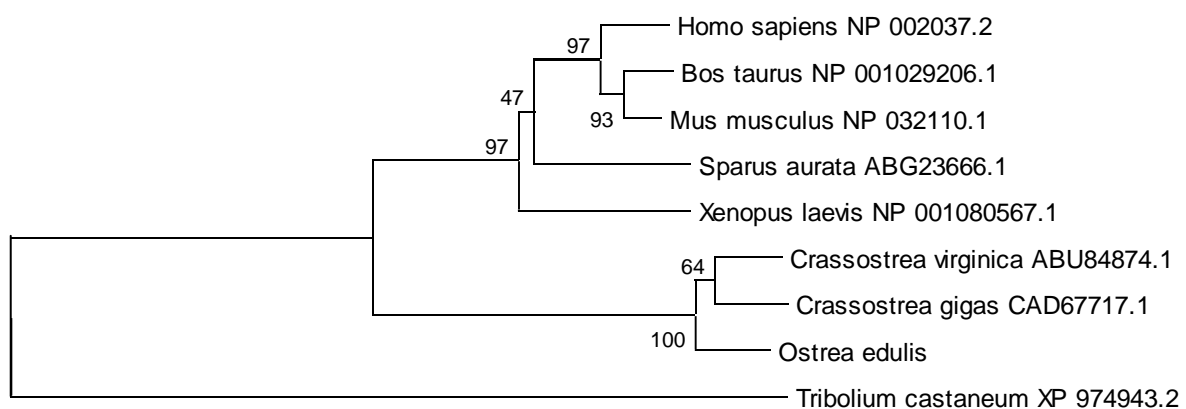


Fig. 8



0.05

| Genes | Reference gene name | Cellular functions |
|---------------|--|--|
| ACT | β -Actin | Cytoskeleton structure protein |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Oxydoreductase in glycolysis and gluconeogenesis |
| Ubiq | Polyubiquitin | Protein degradation |
| EF-1 α | Elongation factor alpha | Translation eukaryotic factor |
| L5 | Ribosomal L5 | Ribosome submit |

Table 1 Candidate genes evaluated for reference genes during an *in vitro* infection between haemocytes from flat oyster *Ostrea edulis* and the parasite *Bonamia ostreae*.

| Genes | Sequences 5'-3' | Amplicon length (bp) | Annealing temperature (°C) |
|---------------|---|----------------------|----------------------------|
| ACT | Forward: ACCAGTTGTACGACCGGAAG Reverse: CACGGTATCGTCACCAACTG | 234 | 60 |
| GAPDH | Forward: TCCCGCTAGCATTCCCTTG Reverse: TTGGCGCCTCCTTTCATA | 108 | 60 |
| Ubiq | Forward: ACCAAATGAAGCGTGGATTG Reverse: TGAGGTCGAACCATCAGACA | 165 | 60 |
| EF-1 α | Forward: GTCGCTCACAGAAGCTGTACC Reverse: CCAGGGTGGTTCAAGATGAT | 162 | 60 |
| L5 | Forward: TCAGTGCAGAGGTTACACAGG Reverse: TAGCAGCATGGCACTTTTG | 171 | 60 |

Table 2 Housekeeping gene primers and characteristic for quantitative real time PCR.

Table 3

| Genes | GAPDH | L5 | EF-1 | ACT | Ubiq |
|-------|-------|------|------|------|------|
| Ct | 21 | 19,9 | 19,1 | 16,1 | 18 |
| sd | 1,2 | 1,2 | 1,4 | 1,5 | 0,9 |
| E | 96 | 95 | 100 | 96 | 95 |

Table 3 Descriptive statistics of threshold cycles (Ct) of 5 housekeeping genes. (E) Quantitative PCR efficiency of the candidate housekeeping genes. (Sd) corresponds to standard deviation (n=8).

IV Résultats complémentaires

IV.1 Caractérisation et étude de l'expression du gène *Oe-MyD88*, codant une protéine adaptatrice de la voie de signalisation IL-1 et Toll like récepteur.

Les voies de signalisation (MAP kinase, IMD et NF- κ B) sont impliquées dans la réponse au stress et la réponse immunitaire. La voie NF- κ B joue un rôle important dans la réponse immunitaire contre des agents infectieux (virus, bactéries et protozoaires). Ghosh *et al.* (1998) ont décrit que la voie NF- κ B semble très conservée au cours de l'évolution. Cette voie de signalisation fait intervenir les produits codés par un grand nombre de gènes, plus particulièrement impliqués dans la réponse inflammatoire (Hoffman *et al.*, 1999 ; Hoffman et Reichhart, 2002). Cette voie de signalisation a été complètement caractérisée chez les vertébrés ainsi que chez certains invertébrés (Montagnani *et al.*, 2004). Cette voie de signalisation implique notamment des Toll-like récepteurs (TLRs). Les TLRs sont impliqués dans la reconnaissance des organismes pathogènes. Les TLRs sont des protéines contenant un motif TIR (Toll/interleukin-1 (IL-1)) (Bowies *et al.*, 2000 ; Liew *et al.*, 2005). Ce motif TIR interagit avec une protéine adaptatrice cytosolique le MyD88 (Slack *et al.*, 2000 ; Beutler, 2004). La protéine MyD88 contient deux domaines particuliers : un domaine TIR en C-terminale et un domaine DD (Death Domain) dans la partie N-terminale. L'inhibition du MyD88 induit une non activation de la cascade d'activation de NF- κ B (Liew *et al.*, 2005). Le MyD88 joue ainsi un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire.

Plusieurs éléments de cette voie de signalisation ont été caractérisés chez différents mollusques marins comme l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Escoubas *et al.*, 1999 ; Montagnani *et al.*, 2004 ; Montagnani *et al.*, 2008 ; Tirapé *et al.*, 2007), l'huître australienne, *Saccostrea glomerata* (Green *et al.*, 2009), l'huître perlière, *Pinctada fucata* (Xiong *et al.*, 2008 ; Zhag *et al.*, 2009), l'ormeau *Haliotis diversicolor supertexta* (Jiang *et al.*, 2007) et le pétoncle *Chlamys farreri* (Qiu *et al.*, 2007).

VI.1.1 Identification du gène OeMyD88 par RACE PCR

Chez l'huître plate, *Ostrea edulis*, aucun élément de la cascade d'activation de la voie NF- κ B n'a été à ce jour identifié. Après analyse des séquences disponibles dans les bases de données publiques, le choix s'est porté sur MyD88, identifié chez plusieurs espèces de mollusques bivalves. Un alignement multiple de séquences d'acides aminés a permis de déterminer une région du gène très conservée (AHSMSPGARS) (**Figure 37**). La séquence complète du gène a été obtenue par RACE PCR à partir de ADNc d'huître plate *Ostrea edulis* en utilisant une amorce dessinée dans la séquence codant ce motif conservé.

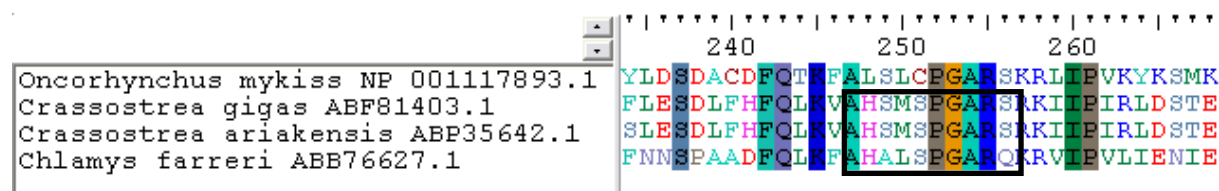


Figure 37 : Alignement des séquences protéiques d'OeMyD88 chez *Oncorhynchus mykiss*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea ariakensis*, *Chlamys farreri*

La séquence complète d'OeMyD88, composée de 964 nucléotides (nt), a été déposée sous GenBank (GU814272). La séquence contient une courte région 5' non traduite (1-105 nt), suivie par un ORF de 558 nt (185 codons: 106-663 nt) et se termine par une région 3' non traduite (664-964 nt) avec un signal de polyadénylation (AATAAA) 10 nt en amont de la queue polyA (**Figure 38**). La séquence en acides aminés déduite de l'ORF a montré une masse moléculaire prédite de 21377,81 Da et un point isoélectrique de 9,22 (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). L'analyse de l'ORF a révélé la présence du domaine Toll interleukine receptor (TIR).



Figure 38 : Séquence du gène OeMyD88. Le domaine TIR est souligné en noir. Le signal de polyadénylation est encadré

IV.1.2 Analyse phylogénétique du gène OeMyD88

L'arbre phylogénétique basé sur les séquences d'acides aminés de OeMyD88 provenant de différentes espèces a montré que OeMyD88 appartient au « groupe des mollusques» (**Figure 39**). Dans ce groupe figurent *Chlamys farreri*, *Crassostrea gigas* et *C. ariakensis*. OeMyD88 constitue un unique sous groupe proche d'un autre sous groupe constitué de *C. gigas* et *C. ariakensis*.

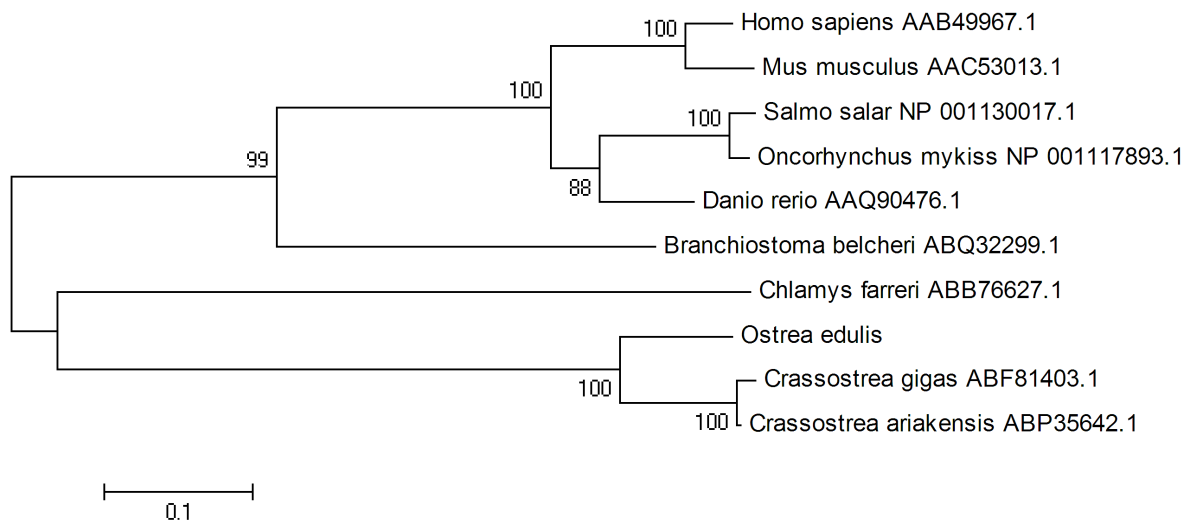


Figure 39 : Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) des séquences d'acides aminés MyD88 provenant de diverses espèces. Bootstrap : 1000 répétitions. L'échelle de la longueur des branches (0,1 substitutions / site) figure sous l'arbre

IV.1.3 Analyse du niveau d'expression du gène OeMyD88 chez des hémocytes d'huître plate infectés par le parasite *Bonamia ostreae*

L'identification de ce gène a permis de tester OeMyD88 par PCR en temps réel afin d'évaluer et comparer le nombre de transcrits après infection *in vitro* entre des hémocytes infectés et des hémocytes seuls.

L'analyse par PCR en temps réel n'a pas permis de montrer une régulation significative ($0,45 \pm 0,5$) d'OeMyD88 chez les hémocytes infectés par le parasite.

Cette étude a permis de caractériser le gène OeMyD88 par une recherche de motif fortement conservé entre des espèces proches génétiquement d'*Ostrea edulis*. Ce résultat ouvre des possibilités de transfert de connaissances génétiques inter-espèces au sein des huîtres. De plus, l'expression de ce gène ne semble pas modulée par le parasite *Bonamia ostreae*.

IV.2 Caractérisation du gène Oe-C1q

Le gène C1q est un composé du complexe C1 du complément. Le système du complément est un groupe de 35 protéines connues du sérum ainsi que des protéines de surface cellulaire qui jouent un rôle essentiel dans la réponse innée et adaptative de défense de l'hôte (Nokana & Smith, 2000 ; Boshra & Sunyer, 2006). Le système du complément peut être activé par trois voies: la voie dépendante des anticorps classiques, la voie alternative anticorps indépendant et la voie des lectines.

Le complexe C1 est une protéine de reconnaissance de la voie classique du complément jouant un rôle crucial dans la reconnaissance des structures de surface des pathogènes et des complexes anticorps-antigène, afin d'ouvrir la voie de la médiation et de l'immunité adaptative (Kishore *et al.*, 2004). En outre, C1q est considérée comme une protéine polyvalente de reconnaissance (PRP), liant directement à un large éventail de micro-organismes pathogènes associés à des motifs moléculaires (PAMP) des bactéries, virus et parasites (Medizhitov & Janeway, 2006 ; Bohlson *et al.*, 2007). Agissant comme une lectine, le C1q active le système du complément, comme chez les vertébrés inférieurs (Matsushita *et al.*, 2004). Pour cette raison, C1q est considéré comme un maillon important de liaison entre l'immunité innée et l'immunité acquise (Kishore & Reid, 2000).

Le C1q-domain-containing (C1q-DC) est une famille de protéines caractérisées par un domaine d'environ 140 acides aminés dans la partie C-terminale avec huit acides aminés hautement conservés, suivie dans la plupart d'entre eux par une région de type collagène et une courte région amino-terminale (Tom Tang *et al.*, 2005).

Le gène C1q-DC a été largement étudié chez les vertébrés, et des nouveaux membres de la famille C1q-domaine ont été récemment décrits. Cette famille ne comprend pas que le complément C1q, mais aussi des protéines du complément comme l'adiponectine, precerebelline (Kishore & Reid, 2000). Toutefois, le C1q et les protéines de la famille du TNF semblent jouer un rôle important dans l'immunité ainsi que l'homéostasie. La superfamille C1q/TNF semble impliquée dans la défense immunitaire, l'inflammation, l'apoptose, l'auto-immunité, et la différenciation cellulaire (Kishore *et al.*, 2004).

Le système du complément a été largement étudié chez les mammifères, mais beaucoup moins chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés. Le gène C1q-DC a été récemment décrit chez le pétoncle *Chlamys farreri* (Zhang *et al.*, 2008), la moule *Mytilus galloprovincialis* (Gestal *et al.*, 2010). Prado *et al.* (2009) ont récemment identifié la protéine C3, C3-Rd, chez la palourde *Ruditapes decussatus*, ce qui démontre la présence de plusieurs composés du complément chez les mollusques bivalves.

Un fragment contenant une partie du domaine C1q a été identifié dans les banques SSH réalisées précédemment. Un travail par RACE CCR a été entrepris afin d'identifier la séquence complète de ce gène.

IV.2.1 Identification du gène C1q par RACE PCR

Des amorces spécifiques ont été dessinées, puis utilisées afin d'obtenir la totalité du gène. La méthode utilisée est la RACE PCR. Le séquençage des produits de PCR obtenus a permis d'identifier un fragment de 853 paires de bases (**Figure 40**). La séquence complète a été déposée sous GenBank (GU814271). La séquence contient une courte région 5' non traduite (1-95 nt), suivie par un ORF de 651 nt (216 codons: 55-705 nt) et se termine par une région 3' non traduite (706-853 nt) avec un polyadénylation signal (AATAAA) 11 nt en amont de la queue polyA (**Figure 40**).

La séquence d'acides aminés déduite de l'ORF a montré une masse moléculaire prédite de 23 461,60 Da et un point isoélectrique de 6,43

(http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). L'analyse de l'ORF, a révélé la présence du domaine C1q (**Figure 40**).

IV.2.2 Analyse phylogénétique du gène OeC1q

L'arbre phylogénétique basé sur les séquences d'acides aminés du domaine C1q provenant de différentes espèces a montré que OeC1q forme un sous groupe avec le domaine C1q identifié chez *Pinctada fucata* (**Figure 41**).

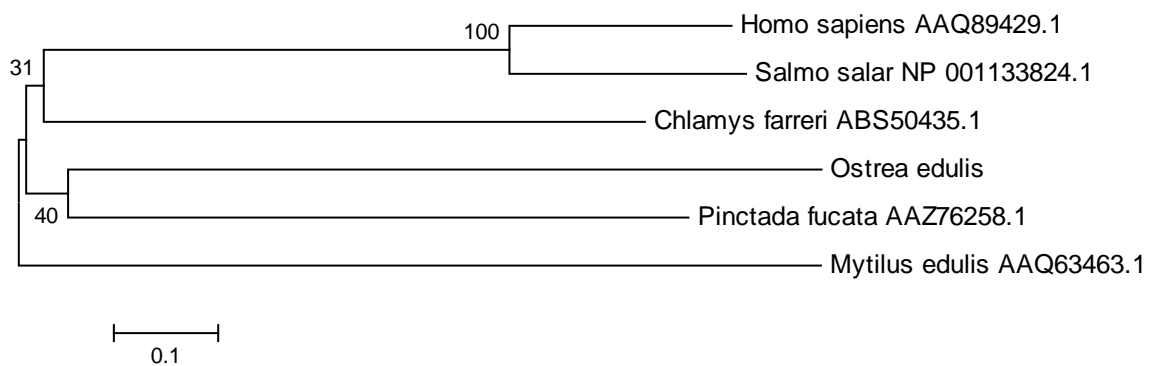


Figure 41 : Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) des séquences d'acides aminés provenant de diverses espèces contenant le domaine C1q. Bootstrap : 1000 réplifications. L'échelle de la longueur des branches (0,1 substitutions / site) figure ci-dessous l'arbre

La caractérisation de ce gène chez *Ostrea edulis* confirme l'existence de gènes appartenant à la voie du complément chez les mollusques. Cependant, cette étude ne permet pas de conclure sur la fonction de ce gène et sur son implication dans la voie du complément. Des approches moléculaires complémentaires sont nécessaires pour de clarifier l'existence de la voie du complément chez *Ostrea edulis*.

V Conclusion

La réalisation de banques soustractives a permis, (1) d'acquérir des données moléculaires chez l'huître plate *Ostrea edulis*, et (2) identifier des ESTs potentiellement impliquées dans les réponses de l'huître au parasite. En parallèle des gènes de ménage d'intérêt ont été testés et validés pour la PCR en temps réel nécessaire à l'étude du niveau d'expression des ESTs sélectionnées.

L'acquisition des données moléculaires et la mise au point d'une technique de PCR en temps réel ont permis d'analyser le niveau d'expression des gènes de l'hôte *Ostrea edulis* en réponse au parasite *Bonamia ostreae* au cours d'infections expérimentales *in vitro*. Plusieurs gènes ont été complètement caractérisés. L'étude du niveau d'expression des gènes d'intérêt a montré une probable implication de certains gènes dans les interactions hôte/parasite. Ces premières données moléculaires ouvrent de nouvelles perspectives d'étude sur le modèle.

3^{ème} Partie

Interactions entre hémocytes d'huître plate (*Ostrea edulis*) et son parasite *Bonamia ostreae*

Interactions entre hémocytes d'huître plate (*Ostrea edulis*) et son parasite *Bonamia ostreae*

Plusieurs études ont été réalisées en condition *in vitro* et au cours d'infections expérimentales *in vivo*. D'une part, les activités hémocytaires ont été mesurées en cytométrie en flux. Pour cela un travail préliminaire de mise au point de protocole a été nécessaire. Sur la base des précédents travaux réalisés au laboratoire (Xue, 1998 ; Gagnaire, 2005) un protocole a été établi pour les hémocytes d'huître plate *Ostrea edulis* pour les activités suivantes ; mortalité cellulaire, estérases, espèces oxygènes réactives et phagocytose. Ces activités ont ainsi pu être mesurées chez des hémocytes infectés *in vitro* avec des parasites vivants et tués à la chaleur (Article 4).

Des infections *in vitro* ont également été réalisées de façon à suivre dans le temps la réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes d'huîtres plates mis en contact avec le parasite *Bonamia ostreae* (Article 5). Cette étude reposait notamment sur des résultats préalablement obtenus et présentés dans l'article 4 et la deuxième partie. La combinaison des deux approches cellulaire et moléculaire a permis d'apporter des éléments complémentaires afin de mieux appréhender les interactions entre les hémocytes d'huître plate et son parasite *B. ostreae*. Enfin, des infections expérimentales *in vivo* ont été entreprises sur deux groupes d'huîtres plates (résistantes et sauvages). L'utilisation des deux groupes d'huîtres plates et de deux modes d'infection expérimentale (injection de parasites ou par cohabitation) a permis d'appréhender les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la bonamiose (Article 6).

Des résultats complémentaires sont également présentés à la fin de cette troisième partie. Ils concernent l'identification des activités enzymatiques de la fraction cellulaire et acellulaire de deux populations d'huîtres plates *Ostrea edulis* et de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

I Effet du parasite *Bonamia ostreae* sur les activités hémocytaires : une première approche

Afin de préciser les modifications induites spécifiquement par le parasite *Bonamia ostreae* sur les activités hémocytaires, des hémocytes d'huîtres plates ont été mis en contact avec des parasites purifiés vivants et inactivés par un traitement à la chaleur (100°C pendant 15 minutes). Deux concentrations de parasite ont été testées (5 et 10 parasites pour 1 hémocyte). Des hémocytes seuls constituaient un témoin pour l'ensemble des mesures réalisées. Les paramètres hémocytaires ont alors été étudiés après deux heures de mise en contact en cytométrie en flux ainsi qu'en microscopie photonique. Les expériences de mise en contact ont été réalisées trois fois en triplicata. Les différentes activités hémocytaires mesurées en cytométrie en flux étaient la mortalité cellulaire, les activités estérases non spécifiques, la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et l'activité phagocytaire. Par ailleurs, les hémocytes mis en contact avec le parasite étaient également observés au microscope photonique après cyto-centrifugation et coloration au kit hémacolor (Merck®).

Après deux heures d'infection *in vitro*, l'observation des cyto-centrifugations a montré que le parasite vivant et mort était bien internalisé dans les hémocytes. De plus, l'analyse de la mortalité cellulaire des hémocytes n'a pas montrée de différences significatives pour toutes les conditions testées. L'internalisation du parasite vivant ou mort n'induit pas de mortalité cellulaire chez les hémocytes. En revanche, le parasite vivant et mort modifie la détection des estérases et la production des EOR. Cette modification est significativement plus importante pour le parasite vivant avec le ratio 1 :10. L'analyse de la capacité de phagocytose n'a pas permis d'observer des différences significatives entre les conditions testées.

Cette étude montre que le parasite est capable de diminuer des activités hémocytaires impliquées dans sa propre dégradation.

Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des interactions entre *Bonamia ostreae* et les hémocytes et plus précisément de l'effet du parasite sur la cellule hôte pour assurer sa survie et sa capacité par la suite à se multiplier dans la cellule. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Fish and Shellfish Immunology* (Morga *et al.*, 2009).

Article n°4 : Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*

Benjamin Morga, Isabelle Arzul*, Bruno Chollet and Tristan Renault

Fish and shellfish immunology 2009 **26** (6): 836-42.

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER);
Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP); La Tremblade, France

Corresponding author. Mailing address: IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 La Tremblade, France. Phone: 33 5 46 76 26 10. Fax: 33 5 46 76 26 11. E-mail: iarzul@ifremer.fr



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

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

Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies in vitro haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*

Benjamin Morga, Isabelle Arzul*, Bruno Chollet, Tristan Renault

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), La Tremblade, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 October 2008
Received in revised form
2 February 2009
Accepted 4 March 2009
Available online 7 April 2009

Keywords:
Bonamia ostreae
Ostrea edulis
Haemocytes
Flow cytometry
Esterase
Reactive oxygen species (ROS)
Phagocytosis

ABSTRACT

Bonamia ostreae is an intracellular protozoan parasite, infecting haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis*. Oyster defence mechanisms mainly rely on haemocytes. In the present study in vitro interactions between parasites and flat oyster haemocytes were investigated using flow cytometry and light microscopy.

Haemocyte parameters including: non specific esterase activity, reactive oxygen species (ROS) production and phagocytosis were monitored using flow cytometry after 2 h cell incubation with live and dead *B. ostreae*. Two ratios of parasites per haemocyte were tested (5:1 and 10:1), haemocytes alone were used as controls and the experiment was carried out three times. Flow cytometry revealed a decrease of non specific esterase activities and ROS production by haemocytes after incubation with live parasites, while there was little difference in phagocytosis activity when compared with controls. Similarly, dead parasites induced a decrease in haemocyte activities but to a lesser extent compared to live parasites. These results suggest that *B. ostreae* actively contributes to the modification of haemocyte activities in order to ensure its own intracellular survival.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The European flat oyster *Ostrea edulis* occurs from Norway to the Bay of Agadir in Morocco and in the Mediterranean and Black Seas. In the late 1960s decline in flat oyster production was attributed to the protozoan parasite *Marteilia refringens* [1–3]. Since 1979, flat oyster production has further declined in France and Europe due to another disease caused by the protozoan parasite, *Bonamia ostreae* [4–6]. Both parasite diseases contributed to drastically reduce the French flat oyster production from 20 000 t per year in the 1970s to 1000 t (data available in the fishstat database, <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFIT/FISHPLUS.asp>). *B. ostreae* was also reported in cultured and wild populations from the Netherlands [7,8], Denmark [9], Spain [10], United Kingdom [11] and Ireland [12].

The natural host of the protozoan parasite *B. ostreae* is the European flat oyster *O. edulis*. Although the parasite can be observed in juveniles [13] and adults, mortality usually occurs in oysters 2 year old and older [14–17]. The parasite is most often observed inside the haemocytes [4,5], but it can also be detected free in connective tissues of the digestive gland and gills [18].

Multiplication of the parasite is associated with haemocyte disruption and huge haemocyte infiltration in the digestive gland, mantle and gills [14,19]. Phylogeny studies demonstrated that the parasite is affiliated with haplosporidians [20,21] and belongs to the phylum of cercozoan [22].

Although methods for in vitro cultivation of the parasite are lacking, a protocol for parasite purification from infected oysters [23] enables in vitro studies on interactions between *B. ostreae* and its host cells, the haemocytes [24].

Three types of haemocytes were reported in the European flat oyster on the basis of morphological criteria: granulocytes (haemocytes with granules, diameter around 10 µm), large hyalinocytes (haemocytes without granules, diameter around 15 µm) and small hyalinocytes (haemocytes without granules, diameter from 5 to 10 µm) [19,24–28].

Haemocytes play a pivotal role in mollusc defence against pathogens. The main cellular immune response consists of phagocytosis [29,30]. Pathogens are internalised and then degraded through hydrolytic enzymes including esterases and production of reactive oxygen species (ROS) [28,31,32]. Esterases are enzymes belonging to the group of hydrolases catalysing the hydrolysis of ester bonds. The respiratory burst is a series of biochemical reactions that produce highly microbicidal ROS including superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical (OH^\bullet). Although radicals produced during the respiratory burst are known to be involved in the destruction of parasites in

* Corresponding author. IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Avenue max du loup, 17390 La Tremblade, France. Tel.: +33 5 46 76 26 50; fax: +33 5 46 76 26 11.
E-mail address: isazul@ifremer.fr (I. Arzul).

different host species including molluscs [33–35], some intracellular parasites like *Leishmania* sp and *Perkinsus marinus* develop strategies to evade this process which allows them to invade and multiply within host cells [36,37].

Some studies demonstrated that the parasite *B. ostreae* was internalised after 30 min of contact with haemocytes and was not degraded after phagocytosis [24,25]. Hervio et al. [38], reported that the parasite possesses catalytic enzymes and acid phosphatase which could inhibit haemocyte activities developed for parasite degradation.

The current study based on flow cytometry was undertaken in order to further investigate mechanisms developed by *B. ostreae* to survive within haemocytes. Haemocyte activities were monitored comparing cells in contact with live and dead parasites as well as haemocytes alone. Parasite internalisation inside haemocytes was also confirmed by light microscopy.

Cell mortality/viability, non specific esterase activities, respiratory burst and phagocytosis were monitored by flow cytometry in order to measure the impact of parasite on immune capacity of oyster haemocytes. Two different levels of parasite were used to test the effect of *B. ostreae* on oyster haemocytes. Based on previous studies [24,39] and on microscopic observation, two ratios were selected 5:1 and 10:1 parasites per haemocyte. In addition, both live and dead parasites were tested and compared in attempt to access the active or passive role played by the parasite in the modification of haemocyte activities.

2. Material and methods

2.1. Biological material

2.1.1. Oysters

Two-year-old flat oysters *O. edulis* were collected from Quiberon Bay (Brittany) in September 2007 and acclimatized in the quarantine facilities of Ifremer laboratory in La Tremblade (Charente-Maritime, France) over 30 days. The oysters were maintained in 120 l raceways supplied with a constant flow of seawater enriched in phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracialis* and *Tetraselmis suecica*).

2.1.2. Haemolymph collection

Haemolymph was withdrawn from the adductor muscle sinus of 10 oysters using a 1 ml syringe equipped with a needle (0.40 mm × 90 mm). To eliminate debris the haemolymph samples were filtered through 60 µm nylon mesh and held on ice to prevent cell aggregation. The volume of haemolymph collected from each oyster was approximately 1 ml, samples were pooled, and haemocyte counts were performed using a Malassez-cell. The haemocyte concentration was adjusted to 5.10^5 cells ml⁻¹ using 0.22 µm filtered sea water (FSW).

2.1.3. Parasite purification

B. ostreae was purified according to the protocol developed by Mialhe et al. (1988) [23]. Briefly, heavily infected oysters were selected by examination of heart tissue imprints using light microscopy. After homogenisation of all the organs except the adductor muscle, parasites were concentrated by differential centrifugation on sucrose gradients and then purified by isopycnic centrifugation on a Percoll gradient. Finally, the purified *B. ostreae* cells were suspended in FSW and counted using a Malassez-cell.

2.1.4. Parasite inactivation

Parasites were inactivated at 100 °C for 15 min and the suspensions of dead parasites were held on ice for 5 min.

2.2. In vitro infection protocol

Haemocytes (5.10^5 cells ml⁻¹) were incubated with live and dead parasites at two ratios (5:1 and 10:1 parasites per haemocyte) for 2 h at 15 °C. The control consisted of haemocytes alone suspended in FSW (5.10^5 cells ml⁻¹). The experiments were performed in triplicate using three different pools of oysters.

2.3. Light microscopy

After 2 h of incubation, 100 µl of each cell suspension were cytocentrifuged ($100 \times g$, 4 °C, 1 min), stained with Hemacolor® (Merck) and examined using light microscopy.

2.4. Flow cytometry analysis

For each sample, 5000 events were counted using an EPICS XL 4 (Beckman Coulter). Based on size discrimination, parasites or other small particles were not counted, only haemocytes were taken into account for cell activity measures. Results were depicted as cell cytograms and reported in log scale fluorescence levels for each marker used. Fluorescence depended on the monitored parameters: non specific esterase activities, ROS production and phagocytosis were measured using green fluorescence while cell mortality was measured using red fluorescence.

2.4.1. Haemocyte mortality/viability

Haemocyte mortality was quantified using 200 µl of cell suspension. Cells were incubated in the dark for 30 min at 4 °C with 10 µl of Propidium Iodide (PI, 1.0 g l^{-1} , Interchim). PI is a fluorescent DNA/RNA-specific dye, which only permeates through the membranes of dead cells and stains the nucleic acids.

2.4.2. Non specific esterase activities

Non specific esterase activities were measured by adding 1 µl of a non specific liposoluble substrate fluorescein diacetate (FDA, Molecular Probes, 400 µmol l^{-1}) to 200 µl of a haemocyte suspension. Cells were incubated for 30 min in the dark at room temperature and then transferred to ice for 5 min to stop the reaction.

2.4.3. ROS production

The respiratory burst was measured using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), a non fluorescent fluorescein which permeates cells and is hydrolysed yielding hydrophilic DCFH. In the presence of hydrogen peroxide, DCFH is oxidised to DCF, a fluorescent product. Intracellular oxidation of DCFH is quantitatively related to oxidative burst in haemocytes. To measure ROS production, 2 µl of DCFH-DA (1 mM) were added to 200 µl of the haemocyte suspension. Cells were incubated for 30 min in the dark at room temperature and then transferred to ice for 5 min to stop the reaction.

2.4.4. Phagocytosis

Phagocytosis capacity of haemocytes was evaluated by using fluorescent beads [26]. Haemocyte suspension (200 µl) was incubated for 1 h in the dark at room temperature with 10 µl of a 1/10 dilution of Fluorospheres carboxylate-modified microspheres (1 µm diameter, Interchim).

2.5. Statistical analysis

A unilateral Test Z was performed to test superiority of the mean number of live vs. dead parasites inside haemocytic cells.

Table 1

Differential haemocyte counts and percentage of infected cells by haemocyte type (granulocyte, large and small hyalinocytes) following 2 h incubation with live and dead parasites (ratio 1:5).

| Total haemocyte counts | Haemocytes with live parasites | Haemocytes with dead parasites |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| | 120 | 110 |
| Granulocytes % (n) | 33% (42) | 29% (32) |
| Infected granulocytes | 72% (31) | 71% (25) |
| Large hyalinocytes % (n) | 48% (55) | 50% (55) |
| Infected large hyalinocytes | 27% (12) | 28% (10) |
| Small hyalinocytes % (n) | 19% (23) | 20% (23) |
| Infected small hyalinocytes | 0 | 0 |
| Parasites average by infected haemocytes \pm Standard error | 3.5 \pm 0.6 | 2 \pm 0.34 |

Flow cytometry results were expressed as percentage of positive cells. In order to detect an effect of tested conditions, an ANOVA was performed using XLSTAT-Pro[®] version 7.5.3 software. Values were converted into r angular arcsinus $\sqrt{\%}$ of positive cells) before analysis to ensure the respect of *a priori* assumptions of normality and homogeneity. In the case of rejection of H_0 , an *a posteriori* Tukey test was used to compare differences between means.

3. Results

3.1. Detection of parasites in haemocytes

Following 2 h of *in vitro* contact between haemocytes and *B. ostreae* (ratio 1:5), observations showed that both live and dead parasites were engulfed by the flat oyster haemocytes (Table 1). However, larger numbers of live parasites (average of 3.5 parasites per infected haemocyte) were detected in oyster haemocytes

compared to dead parasites (average of 2 parasites per infected haemocyte) ($p < 0.05$). Parasites (live or dead) were only detected in large hyalinocytes and in granulocytes (Fig. 1) and not in small hyalinocytes.

3.2. Haemocyte activities in the presence of *B. ostreae*

Prior to haemocyte activity measurement, cell survival was checked by deducing cell mortality based on PI labelling. Whatever was the tested condition, percentage of live cells was never below 93.5%. Cell mortality was considered as equivalent between all tested conditions (Table 2).

For non specific esterase activities (Fig. 2) and ROS (Fig. 3), two different populations of cells were distinguished (population of negative cells producing no non specific esterase activities or no ROS and population of positive cells producing non specific esterase activities or ROS) according to the fluorescence intensity. For phagocytosis, populations were defined according to a protocol previously described [26,40,41] (Fig. 4).

3.2.1. Non specific esterase activities

The percent of haemocytes positive for non specific esterase activities was $70.3 \pm 13.7\%$ in the control, $32.2 \pm 1.8\%$ after incubation with a 5:1 ratio of live parasites, $17.4 \pm 3.4\%$ after incubation with 10:1 ratio of live parasites, $41.9 \pm 3.3\%$ after incubation with a 5:1 ratio of dead parasites and $34.16 \pm 10.3\%$ after incubation with a 10:1 ratio of dead parasites, respectively (Fig. 5). In presence of live and dead parasites (ratios 5:1 and 10:1), population of positive cells for esterase activities decreased significantly compared to the control ($p < 0.0001$). Live parasites at a ratio 10:1 induced a significantly more important decrease compared to live parasites at a ratio 5:1 and compared to dead parasites at ratios 5:1 and 10:1 ($p < 0.001$).

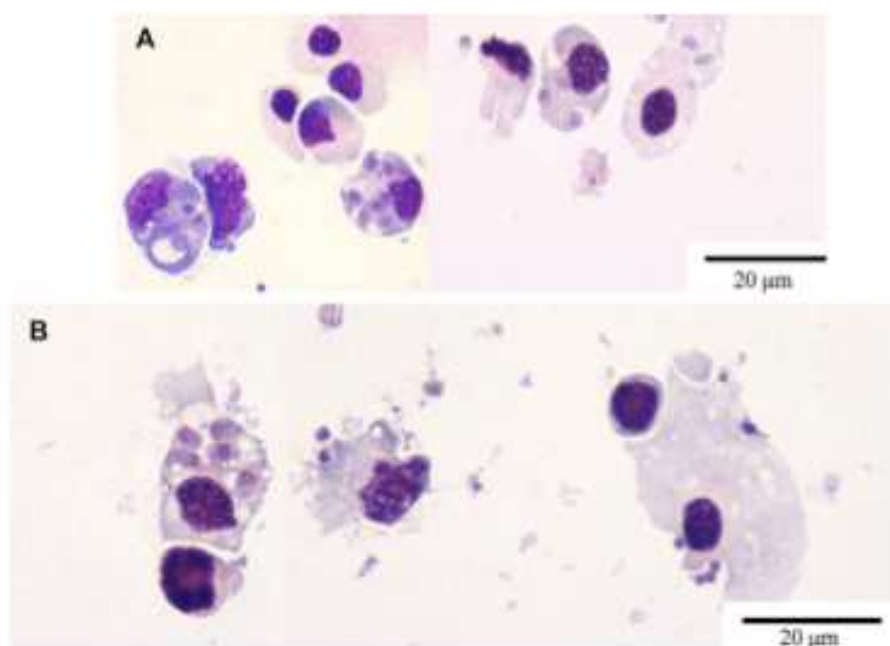


Fig. 1. Haemocytes from *Ostrea edulis* stained with Hemacolor[®] Merck following cytocentrifugation (A) Haemocytes after 2 h incubation with live *Dinanisia ostreae*; (B) Haemocytes after 2 h incubation with dead *B. ostreae*.

Table 2

Percentages of viable haemocytes after 2 h of incubation with live and dead parasites at 5:1 and 10:1 ratios. Control = haemocytes alone. Values are means of three replicates and correspond to standard error.

| | Control Haemocytes | Haemocytes + parasites (5:1) | Haemocytes + parasites (10:1) | Haemocytes + dead parasites (5:1) | Haemocytes + dead parasites (10:1) |
|-------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| % of viable cells | 96% | 97.1% | 90% | 95% | 93.5% |
| SD | ±0.5 | ±0.5 | ±0.8 | ±0.4 | ±2 |

3.2.2. ROS production

The percent of ROS positive haemocytes was $61 \pm 19.8\%$ in the control, $21.3 \pm 4.1\%$ after incubation with a 5:1 ratio of live parasites, $12.0 \pm 2.5\%$ after incubation with 10:1 ratio of live parasites, $33 \pm 3.4\%$ after incubation with a 5:1 ratio of dead parasites and $26.9 \pm 4\%$ after incubation with a 10:1 ratio of dead parasites, respectively (Fig. 6). In presence of live and dead parasites (ratios 5:1 and 10:1), population of ROS positive cells decreased significantly compared to the control ($p < 0.0001$). Percentages of ROS positive cells for haemocytes in contact with live parasite at a 10:1 ratio were significantly different from those of haemocytes in presence of dead parasites at a ratio 5:1 ($p < 0.0001$) and at a ratio 10:1 ($p < 0.002$).

3.2.3. Phagocytosis assay

Comparison of the percent of haemocytes positive for phagocytosis showed only minor differences between controls and the tested conditions (Fig. 7). Regardless of test conditions, 30–40% of the haemocytes engulfed 3 or more than 3 beads after 2 h.

4. Discussion

Although previous studies based on flow cytometry aimed at describing haemocyte morphology and activities in oysters [26,42,43], abalone [44] or mussels [45], flow cytometry has rarely been used to investigate interactions between molluscs and

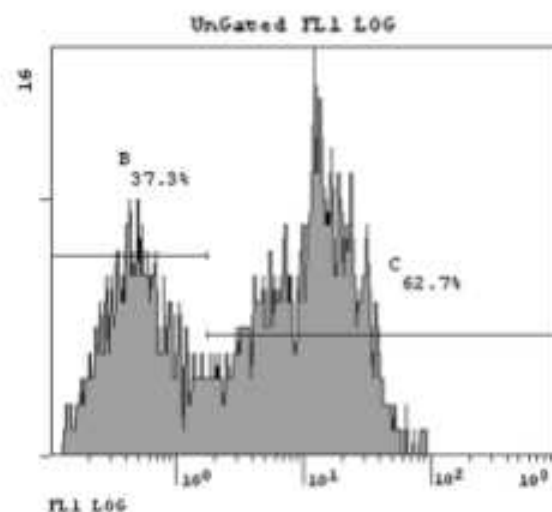


Fig. 3. Cytogram of cells stained with DCFH-DA, substrate used to measure reactive oxygen species (ROS). Horizontal-axis, intensity of fluorescence. Vertical axis, number of cells; (B) population of cells negative for ROS; (C) population of cells positive for ROS.

pathogens, more specifically pathogens infecting haemocytes [40,46–48].

In the present study, flow cytometry and light microscopy were used to determine the effects of both live and dead *B. ostreae* at two different ratios on haemocyte parameters of flat oysters *O. edulis*. The tested ratios 5 parasites and 10 parasites per haemocyte were chosen based on previous studies [24,39] and are expected to reflect the conditions of haemocytes exposed under high level *in vivo* infections. *In vitro* assays were conducted by incubating haemocytes with purified parasites for 2 h at 15 °C.

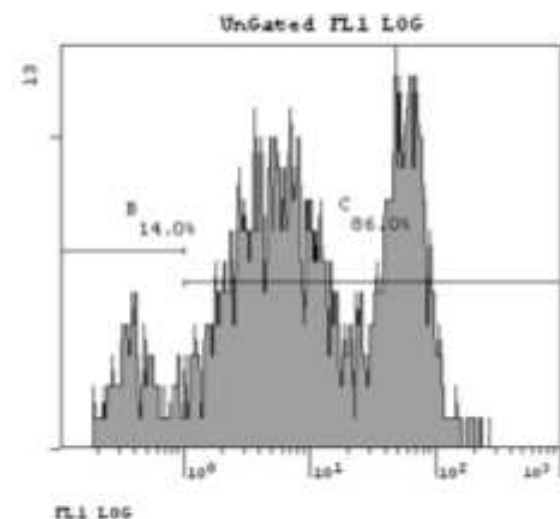


Fig. 2. Cytogram of cells stained with FDA, substrate used to measure non specific esterase activities. Horizontal-axis, intensity of fluorescence. Vertical axis, number of cells; (B) population of cells negative for non specific esterase activities; (C) population of cells positive for non specific esterase activities.

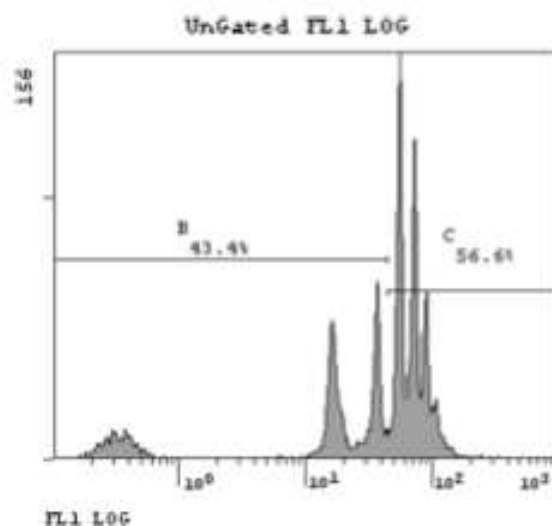


Fig. 4. Cytogram of cells incubated with fluorescent beads. Horizontal-axis, intensity of fluorescence. Vertical axis, number of cells; (B) population of cells which engulfed 0–2 beads; (C) population of cells which engulfed 2 or more beads.

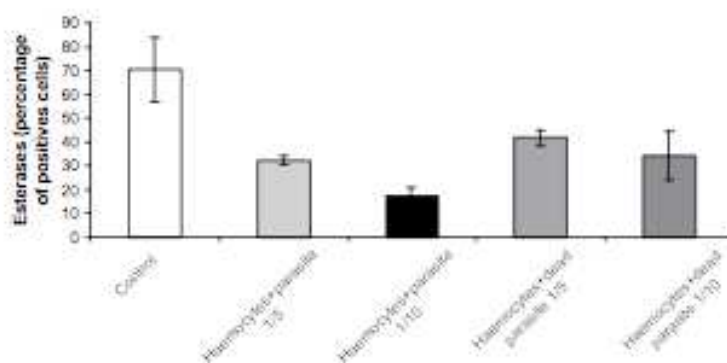


Fig. 5. Percentage of haemocytes positive for non specific esterase activity after 2 h of incubation with live and dead parasites at 5:1 and 10:1 ratios. Control – haemocytes alone. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation.

The temperature and the incubation period were selected according to previous studies [24,25,49,50]. In a previous study after a contact of 30 min, parasites were engulfed by haemocytes, and after 4 h, vacuoles containing *B. ostreae* were observed within haemocytes [51]. A 2 h incubation was deemed sufficient to measure effects of the parasite on post phagocytosis mechanisms. Microscopic examination of cyto-centrifuged cells confirmed that both live and dead parasites were engulfed by haemocyte but not destroyed after 2 h of incubation [24]. Internalisation of dead parasites suggests that the process is mediated by haemocytes themselves. Chagot et al. [25] demonstrated that parasites were not engulfed when haemocytes were treated with cytochalasin B prior parasite contact. These results support an active participation of host cells in the internalisation of the parasite. However, the same study [25], demonstrated that the treatment of parasites with cytochalasin B prior to cell contact induced a significant decrease of parasite internalisation. These results also suggest that the parasite may play an active role for its own internalisation in oyster haemocytes. In our study, higher numbers of live parasites were detected in oyster haemocytes compared to dead parasites confirming that the entry of the parasite in haemocyte may also be mediated by the parasite itself.

Cell mortality did not show an increase in haemocyte mortality after contact with dead or live parasites. This result suggests that *B. ostreae* does not kill haemocytes soon after internalisation and that the conditions used in our experiments did not affect the viability of haemocytes.

In order to investigate interactions between *B. ostreae* and haemocytes, we measured non specific esterase activities and ROS. Although non specific esterase activities were recognized as reflecting the global activity of haemocytes, esterases may be also involved in degradation of internalised particles after phagocytosis. We also tested the ability of haemocytes to phagocyte live and dead parasites. These parameters were previously used to measure the effects of abiotic factors including temperature or salinity [40,52] or biotic factors [48] on haemocyte activities.

The presence of parasites significantly modified non specific esterase activities of haemocytes. Live parasites induced a decrease in percentage of non specific esterase activities positive cells. Although dead parasites modified the percentage of non specific esterase activities positive haemocytes when present at a 10:1 ratio, it was at a lesser extent when compared to live parasites. These results, in addition to the lack of haemocyte mortality, suggest a direct impact of parasites on host cell esterase activities.

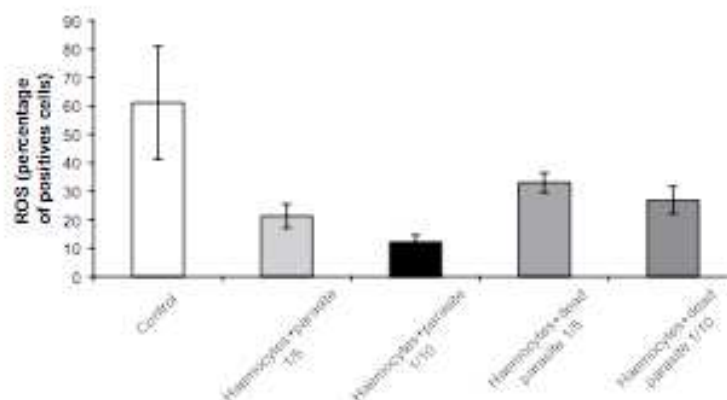


Fig. 6. Percentage of haemocytes positive for ROS after 2 h of incubation with live and dead parasites at 5:1 and 10:1 ratios. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation.

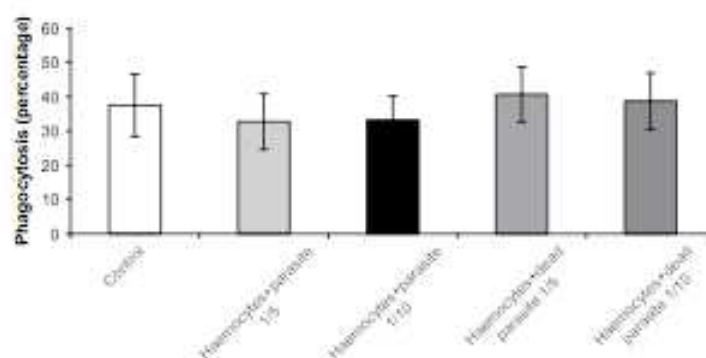


Fig. 7. Percentage of haemocytes positive for phagocytosis after 2 h of incubation with live and dead parasites at 5:1 and 10:1 ratios. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation.

Catalytic enzymes present in *B. ostreae* [38] might be able to inhibit hydrolases (ie esterases) produced by haemocytes.

Similarly, the presence of *B. ostreae*, (particularly live parasites) significantly modified ROS detection in haemocytes. In all test conditions the percentage of ROS positive haemocytes decreased after 2 h of incubation with parasites. The decrease was significantly more pronounced in presence of live *B. ostreae* compared to dead ones. As no cell mortality was detected, parasites may have a direct impact on haemocyte ROS production. The inhibition of oxygen radical production facilitates intracellular survival of protozoan parasites including *Trypanosoma* sp [53], *Toxoplasma* sp [54,55] and *Leishmania* sp [56].

A study carried out to describe interactions between haemocytes from *Crassostrea virginica* and the parasite *P. marinus* showed that live parasites induced an inhibition of ROS release from oyster haemocytes whereas heat killed parasites did not modify ROS production [57]. Inhibition of ROS production was also reported in haemocytes from *Pecten maximus* incubated with live Rickettsiales-like organisms [58]. *P. marinus* and Rickettsiales-like organisms possess acid phosphatase, partly responsible for the suppression or inhibition of ROS production [58,59]. Hervin et al. [38] demonstrated the presence of acid phosphatase activity in haplosporosomes of *B. ostreae*. Acid phosphatase can inactivate the production of NAD(P)H oxidase and thus prevents ROS production. The level of acid phosphatase activity in *B. ostreae* is equivalent [38] to levels found in several *Leishmania* species [60] in which the inhibitor role of the NAD(P)H oxidase has been shown.

Latex beads were used to measure the phagocytosis ability of haemocytes following 2 h of incubation with parasites. Phagocytosis measurements showed little variation between the control (haemocytes alone) and the tested conditions, suggesting that neither live or dead parasites stimulate or inhibit phagocytosis ability of haemocytes.

Phagocytosis plays an important role in interactions between host and pathogens. Many intracellular parasites stimulate their own phagocytosis through activation of receptors or production of actin filaments. In our study, phagocytosis ability of haemocytes against inert material like latex beads was not affected by the presence of parasites. However, the use of bacteria could better reflect response of haemocytes against pathogenic organisms. Besides, recent tests were performed to measure latex bead phagocytosis in presence of parasites by using a higher size discriminant than the one used in the present study. This protocol modification allowed to observe a decrease of phagocytic ability of haemocytes after 4 h of incubation with parasites (Morga, pers com).

In conclusion, the present study investigated the effect of the parasite *B. ostreae* on haemocyte activities using flow cytometry after 2 h of in vitro incubation. Light microscopy confirmed that live and dead parasites were engulfed by the haemocytes after 2 h of contact. After its entry into the haemocyte, the parasite induced changes within the host cell including a modification of cellular activities necessary to escape the degradation by haemocytes. These results contribute to a better understanding of the interactions between *B. ostreae* and haemocytes and more specifically the effect of the parasite on the host cell to ensure its survival and its ability to multiply within the cell.

Acknowledgement

The authors are very grateful to Dr. Gary Meyer (Pacific Biological Station, Nanaimo, Canada) for revising the manuscript. The Region of Poitou Charente and IFREMER supported this research. The authors thank Raphael Brizard and his team for technical assistance for the maintenance of oysters in raceways in Ifremer La Tremblade quarantine.

References

- [1] Comps M. Observation sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates *Ostrea edulis* dans le bassin de Marennes. *Rev Trav Inst Pêches Marit* 1970;34(3):317–26.
- [2] Herrbach B. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate *Ostrea edulis*. *Rev Trav Inst Pêches Marit* 1971;35(1):79–87.
- [3] Grizel H, Comps M, Bouain J, Coustéran F, Douhal J, Le Pennec MA. Recherche de l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis*. *Science et pêche. Bull Inst Pêches Marit* 1974;240:7–30.
- [4] Pichot Y, Comps M, Tige G, Grizel H, Babouin MA. Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Rev Trav Inst Pêches Marit* 1979;43(1):131–40.
- [5] Comps M, Tige G, Grizel H. Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L.C.R. *Acad Science Paris* 1980;200(Série D):383–5.
- [6] Comps M. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse De Doctorat D'état. En Sci Naturlles. Université de Montpellier, 1983.
- [7] Van Banning P. Control of *Bonamia* in Dutch oyster culture, 20–23 September 1983. In: Ellis AE, editor. *Fish and shellfish pathology, proceedings of a symposium*. Plymouth, London: Academic Press; 1985. p. 359–6.
- [8] Van Banning P. Observations on bonamiasis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 1991;95(3):205–11.
- [9] Elston RA, Kent ML, Wilkinson MT. Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 1987;64(3):237–42.
- [10] Montes J. Development of *Bonamia ostreae* parasitosis of flat oyster, *Ostrea edulis*, from Galicia, northwest Spain. In: Perkins FO, Cheng TC, editors. *Pathology in marine science*. San Diego CA (USA): Academic Press; 1990. p. 223–7.

- [11] Buckle D, Hepper B. *Bonamia ostreae* infecting *Ostrea edulis* in the UK. Bull Eur Assoc Fish Pathol 1987;7(3):75–80.
- [12] Rogan E, Culloty SC, Corra TF, Mulcahy MF. The detection of *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980) in frozen oysters (*Ostrea edulis* L.) and the effect of the parasite on condition. Aquaculture 1991;97(4):311–5.
- [13] Lynch SA, Armitage DV, Wilde S, Mulcahy MF, Culloty SC. The susceptibility of young pre-spawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. J Shellfish Res 2005;24(4):1019–25.
- [14] Balolet G, Pider M, Cabour A. Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. Aquaculture 1983;34:1–14.
- [15] Lacortes-Martínez J, Robledo JAE, Figueras A. Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). Aquaculture 1995;130(2):15–23.
- [16] Culloty SC, Mulcahy MF. Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the South coast of Ireland. Aquaculture 1996;144(1–3):53–63.
- [17] Grizel H. Etude des nématodes épinoïdes de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et de leur impact sur l'aquaculture bretonne. Thèse De Doctorat DEtat En Sci Naturelles, Université de Montpellier, 1985.
- [18] Montes J, Anadón R, Azevedo C. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. J Invertebr Pathol 1994;63(1):1–6.
- [19] Cochenner-Laurean N, Auffret M, Renaud T, Langlade A. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. J Invertebr Pathol 2003;63(1):23–30.
- [20] Cochenner N, Le Roux F, Berthe E, Gerard A. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. J Invertebr Pathol 2000;70(1):26–32.
- [21] Carnegie RB, Barber BJ, Culloty SC, Figueras AJ, Distel DL. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. Dis Aquat Org 2000;42(3):199–206.
- [22] Cavalier-Smith T, Chao EE. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). Protist 2003;154(3–4):341–58.
- [23] Mialhe E, Bacheire N, Auffret M, Renaud T, Grizel H. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture 1988;71(4):293–9.
- [24] Mourton C, Boulo V, Chagot D, Hervio D, Bacheire N, Mialhe E, et al. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): in vitro system establishment. J Invertebr Pathol 1992;59(3):235–40.
- [25] Chagot D, Boulo V, Hervio D, Mialhe E, Bacheire N, Mourton C, et al. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): entry mechanisms. J Invertebr Pathol 1992;59(3):241–9.
- [26] Xue Q-G, Renaud T, Chłomoczyk S. Flow cytometric assessment of hemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. Fish Shellfish Immunol 2004;11(7):557–67.
- [27] Auffret M. Morphologie comparative des types hématocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse De 3^{ème} Cycle Université De Bretagne Occidentale 1985.
- [28] Bacheire N, Hervio D, Mialhe E. Luminal dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. Dis Aquat Org 1991;11:173–80.
- [29] Cheng TC. Invertebrate blood cells. Academic Press of London, 1981. 233–99.
- [30] Fisher SW. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Iribarren M, editor. Immunity in invertebrates, 3; 1986, p. 25–35.
- [31] Pipe RK, Porte C, Livingstone DR. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. Fish Shellfish Immunol 1993;1(3):221–33.
- [32] Carballal M, López C, Azevedo C, Villalba A. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. J Invertebr Pathol 1997;70(2):96–105.
- [33] Jorrelles J, Guerin MC, Koch P. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. CR Acad Sci Paris, série II; science de la vie 1996;319:209–18.
- [34] Humphries JE, Yoshino TF. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. Dev Comp Immunol 2008;32(5):554–62.
- [35] Hahnlik BK, Bayne CJ. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. J Parasitol 2001;87:292–9.
- [36] Demire J-F, Desjardins M. Survival of intracellular pathogens within macrophages. Protozoa 1995;210:11–24.
- [37] Schott EJ, Pecher WL, Okafor Florence, Vasis GR. The protozoan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. Exp Parasitol 2003;105:232–40.
- [38] Hervio D, Chagot D, Godin P, Grizel H, Mialhe E. Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Ascetospora), an intrahemocyte protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). Dis Aquat Org 1991;12(1):67–70.
- [39] Cochenner N. *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*, sa position taxonomique parmi les parasites du groupe "Microcell," analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse de Doctorat, Biologie cellulaire, Université de la Rochelle, France, 2001.
- [40] Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renaud T. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish Shellfish Immunol 2006;20(4):536–47.
- [41] Héjaret H, Wikfors GH, Soudant P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. J Exp Mar Biol Ecol 2003;293(2):249–65.
- [42] Allan B, Ashton-Nixon KA, Ford SE. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol 2002;13(2):141–58.
- [43] Goedken M, De Guise S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defense mechanisms. Fish Shellfish Immunol 2004;16(4):539–52.
- [44] Trovers M-A, Mirella da Silva P, Le Goic N, Marie D, Dornval A, Fouchette S, et al. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. Fish Shellfish Immunol 2008;24(4):400–11.
- [45] Soares-da-Silva JM, Ribeiro J, Valongo C, Pinto R, Vilanova M, Bieher R, et al. Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Aradonta cygnea*. Comp Biochem Physiol A 2002;132:541–53.
- [46] Lambert C, Soudant P, Chagot G, Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. Fish Shellfish Immunol 2003;15(3):225–40.
- [47] Garcia-Garcia E, Prado-Alvarez M, Novoa B, Figueras A, Rozales C. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. Dev Comp Immunol 2008;32(6):637–53.
- [48] Da Silva PM, Héjaret H, Lambert C, Wikfors GH, Le Goic N, Shumway SE, et al. Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia setiformis*, and possible interactions. Toxicon 2008;51(4):563–73.
- [49] Fisher WS, Auffret M, Balolet G. Response of European flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. Aquaculture 1987;67(1–2):179–90.
- [50] Fisher WS. In vitro binding of parasites (*Bonamia ostreae*) and latex particles by hemocytes of susceptible and insusceptible oysters. Dev Comp Immunol 1988;12(1):43–53.
- [51] Chagot D. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hématocytes d'*Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude in vitro de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Thèse Du Diplôme De L'école Pratique Des Hautes Etudes De Montpellier, 1989.
- [52] Savaré S, Hendawi M, Brousseau P, Fournier M. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. Ecotoxicol Environ Saf 2002;52(1):21–9.
- [53] Penketh PC, Seminsky WPK, Patton CL, Sartorelli AC. Trypanosomatid hydrogen peroxide metabolism. FEBS Lett 1987;223(2):427–31.
- [54] Murray HW, Nathan CF, Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. J Exp Med 1980;152:1010–24.
- [55] Shrestha SP, Tamita T, Weiss LM, Orlóvsky A. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. Int J Parasitol 2005;35(4):433–41.
- [56] Murray HW. Susceptibility of leishmania to oxygen intermediate and killing by normal macrophage. J Exp Med 1983;153:1302–15.
- [57] Volety AK, Chu FLE. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Dev Comp Immunol 1995;19:135–42.
- [58] Le Gall G, Mialhe E, Chagot D, Grizel H. Epizootiological study of rickettsioids of the Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*. Dis Aquat Org 1991;10:139–45.
- [59] Volety AK, Chu FLE. Acid phosphatase activity in *Perkinsus marinus*, the protozoan parasite of the American oyster, *Crassostrea virginica*. J Parasitol 1997;83(6):1083–8.
- [60] Lovelace JK, Gottlieb M. Effect of tunicamycin on the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani* promastigotes. Mol Biochem Parasitol 1987;22(1):19–28.

II Réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes d'huître plate suite à une infection *in vitro* par le parasite *Bonamia ostreae* : un suivi au cours du temps

Des expériences *in vitro* ont été réalisées afin de poursuivre l'étude des interactions entre les hémocytes d'*Ostrea edulis* et du parasite *Bonamia ostreae* purifié. La réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes a été évaluée par microscopie photonique, cytométrie en flux et PCR en temps réel après 1h, 2h, 4h et 8h d'infection *in vitro*.

Tout d'abord, la microscopie optique a été utilisée pour suivre la phagocytose des parasites par les hémocytes. Les parasites ont été observés à l'intérieur des hémocytes après 1h et le nombre moyen de parasites par hémocyte augmente au cours du temps de l'expérimentation. De plus, les observations ont montré que le parasite se divise à l'intérieur des hémocytes, des cellules binuclées ayant été observées après deux heures d'infection et des cellules trinucées après 4h d'infection.

L'utilisation de la cytométrie en flux a permis de suivre les activités hémocytaires telles que les estérases non spécifiques, la production d'EOR et la phagocytose. L'analyse des cytogrammes a montré une diminution de la production des EOR et des estérases après 1h, 2h et 4h d'infection. En revanche la phagocytose est diminuée après deux heures d'infections.

Le suivi de la réponse moléculaire par PCR en temps réel a montré que l'internalisation du parasite induit une modification de la régulation des gènes étudiés. Le parasite induit une sur-expression des gènes codant la galectine (OeGal), le cytochrome P450, le lysozyme et l'oméga glutathione S transférase (OGST). L'étude du niveau d'expression de deux super oxyde dismutases a montré une sous expression de la super oxyde dismutase extracellulaire (Oe-EcSOD) alors que la super oxyde dismutase Cu/Zn (Oe-SOD Cu/Zn) apparaît légèrement sur-exprimée après 1h

de contact. De plus, cette étude a été complétée par le séquençage complet de gènes codant pour l'Oe-SOD Cu/Zn et l'Oe-EcSOD.

La présente étude a permis de suivre au cours du temps la réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes infectés par le parasite *Bonamia ostreae*. Les résultats obtenus démontrent que le parasite est capable de moduler la réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes. La modulation de la réponse de l'hôte par le parasite *Bonamia ostreae* lui permet d'assurer sa survie, de s'installer dans la cellule et de s'y multiplier.

Article n°5 : Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during *in vitro* infection by the parasite *Bonamia ostreae*

(Soumis International Journal for Parasitology)

Benjamin Morga, Tristan Renault, Nicole Faury, Bruno Chollet and Isabelle Arzul*.

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer);
Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP); La Tremblade, France

Corresponding author. Mailing address: Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France. Phone: +33 5 46 76 26 10. Fax: +33 5 46 76 26 11. E-mail: iarzul@ifremer.fr

Abstract

Bonamia ostreae is a protozoan, affiliated to the order of Haplosporidia and to the cercozoan phylum. This parasite is mainly intracellular, infecting haemocytes, cells notably involved in oyster defence mechanisms. Bonamiosis due to the parasite *Bonamia ostreae* is a disease affecting the flat oyster *Ostrea edulis*. The strategies used by protozoan parasites to circumvent host defence mechanisms remain largely unknown in marine bivalve molluscs. In the present work, *in vitro* experiments were carried out in order to study the interactions between haemocytes from *Ostrea edulis* and purified parasite *Bonamia ostreae*. We monitored cellular and molecular responses of oyster haemocytes by light microscopy, flow cytometry and real time PCR 1h, 2h, 4h and 8h post-infection.

Light microscopy was used to measure parasite phagocytosis by oyster haemocytes. Parasites were observed inside haemocytes 1h post infection and the parasite number increased during the time course of the experiment. Moreover, some binucleated and trinucleated parasites were found within haemocytes 2 and 4 h post-infection, respectively suggesting that the parasite can divide inside haemocytes. Host responses to *Bonamia ostreae* were investigated at the cellular and molecular levels using flow cytometry and real time PCR. Phagocytosis capacity of haemocyte, esterase activities and production of Radical Oxygen Species (ROS) appeared modulated during the infection with *B. ostreae*. Expression levels of ESTs selected in this study showed variations during the experiment as soon as 1 h post infection. An up regulation of galectin (OeGal), cytochrome p450, lysozyme, omega glutathione s transferase (OGST), super oxide dismutase Cu/Zn (Oe-SOD Cu/Zn) and a down regulation of the extracellular super oxide dismutase (Oe-EcSOD) was observed in the presence of the parasite. Finally, the open reading frames of both SODs (Oe-SOD Cu/Zn and Oe-EcSOD) were completely sequenced.

These findings provide new insights into the cellular and molecular bases of the host-parasite interactions between the flat oyster *Ostrea edulis* and the parasite *Bonamia ostreae*.

Key words: *Bonamia ostreae*, Protozoan, *Ostrea edulis*, Haemocytes, Real time PCR, Flow cytometry, Super Oxyde Dismutase.

1. Introduction

Diseases due to infectious agents (virus, bacteria or protozoan) might curb oyster production and contribute to financial losses. A better understanding of interactions between the immune system of oysters and pathogens is necessary to control the development of these diseases. However, these interactions are poorly documented in oysters in contrast with other invertebrate species such as insects and nematodes (Gravato-Nobre and Hodgkin, 2005 ; D'Argenio et al., 2001). The immunity defence of invertebrates, including oysters, is based on innate immune responses.

The flat oyster production has experienced high mortality outbreaks since 1979 in Europe associated with protozoans including *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1979). This protozoan is an intracellular parasite affiliated with the order of Haplosporididae and belongs to the phylum of cercozoan (Cochennec et al., 2000 ; Carnegie et al., 2000 ; Cavalier-Smith and Chao 2003). *Bonamia ostreae* infects the haemocytes, the cells involved in oyster defence mechanisms (Cheng, 1981). Three different types of haemocytes have been described in the flat oyster: granulocytes, large hyalinocytes and small hyalinocytes (Auffret, 1985 ; Bachère et al., 1991 ; Chagot et al., 1992 ; Mourton et al., 1992 ; Xue et al., 2001). These cells are responsible for wound repair, phagocytosis and encapsulation (Cheng, 1981 ; Fisher, 1986). The haemocytes are carried by the haemolymph in a semi-open system. Some soluble immune components such as lectins, lysosomal enzymes, and antimicrobial peptides have already been identified in the haemolymph of different bivalves species (Olafsen et al., 1992; Bachère et al., 2004 ; Xue et al., 2004).

The flat oyster *Ostrea edulis* and its parasite *Bonamia ostreae* represent a suitable model to study host-pathogen interactions, notably because of the possibility to reproduce the associated disease, named bonamiosis, in experimental conditions (Mourton et al., 1992).

Intracellular parasites have developed sophisticated strategies to escape host defence mechanisms, thereby finding unique niches where they can survive, and from which they can establish successful infection. As previously described the internalisation of *Bonamia ostreae* by flat oyster haemocytes rapidly induced a diminution of esterase activities and reactive oxygen species (ROS) production (Morga et al., 2009). Esterases are enzymes belonging to the group of hydrolases

catalysing the hydrolysis of ester bonds. The respiratory burst is a series of biochemical reactions that produce highly microbicidal ROS including superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical (OH^\cdot). Although radicals produced during the respiratory burst are known to be involved in the destruction of parasites in different host species including molluscs (Toreilles et al., 1996 ; Hahn and Bayne 2001 ; Humphries and Yoshino 2008), some intracellular parasites including *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii* and *Perkinsus marinus* develop strategies to evade this process which allows them to invade and multiply within host cells (Dermine and Desjardins 1999 ; Schott et al., 2003 ; Shrestha et al., 2006). Similar strategies seem to be developed by the parasite *B. ostreae*. Recently new data obtained on flat oyster genome have allowed identifying some ESTs potentially involved in the host-parasite interactions, including galectin (OeGal), super oxide dismutase (Oe-SOD Cu/Zn), extracellular super oxide dismutase (Oe-EcSOD), cytochrome p450 (CYP450), heat shock protein 90 (HSP90), omega glutathionne S transferase (OGST) and lysozyme. Previous *in vitro* studies have examined the host responses to infection with the parasite at the cellular or at the molecular level, but never by considering both simultaneously (Morga et al., 2009). The study of the immune response in the context of an integrated approach may contribute to better understand the strategies developed by *Bonamia ostreae* to spoil host responses and by *Ostrea edulis* to eliminate the parasite and survive.

In the present study, we have investigated the evolution of the immune defences of *Ostrea edulis* haemocytes after 1h, 2h, 4h and 8h of infection with *Bonamia ostreae*. For that purpose, we combined flow cytometry to measure some haemocyte activities and real-time PCR analysis to measure expression levels of some genes of interest including Oe-Gal, Oe-SOD Cu/Zn, Oe-EcSOD, CYP450, HSP90, lysozyme and OGST.

Bonamia ostreae induced a decrease of haemocyte activities including esterases, production of reactive oxygen species (ROS) and phagocytosis. Quantitative PCR assays showed a modulation of the selected genes during the experiment. In addition, the complete open reading frames of two *Ostrea edulis* genes related to detoxification (Oe-SOD and Ec Oe-SOD) were determined and characterized. These results contribute to better understand host responses and how the parasite installs and survives within haemocytes.

2. Material and methods

2.1 Biological material

2.1.1 Haemolymph collection

Two years old flat oysters *Ostrea edulis* were collected from the Bay of Quiberon (Southern Brittany, France), an endemic zone regarding bonamiosis.

Haemolymph was withdrawn from the adductor muscle using a 1mL syringe equipped with a needle (0.40x90 mm) and then filtered on a 75 µm mesh to eliminate debris. Samples were pooled together and maintained on ice to prevent aggregation. Haemocyte counts were performed using a Malassez cell.

2.1.2 Parasite

Bonamia ostreae was purified according to the protocol of Mialhe et al., (1988). Briefly, heavily infected oysters were selected by examination of heart tissue imprints using light microscopy. After homogenization of all the organs except the adductor muscle, the parasites were concentrated by differential centrifugation on sucrose gradients and then purified by isopycnic centrifugation on a Percoll gradient. Finally, the purified parasites were suspended in FSW. *Bonamia ostreae* cells were then counted using a Malassez-cell.

2.2 In vitro infection protocol

Haemocytes (5.10^5 cells mL⁻¹) were incubated with live parasites at the ratio 5:1 (parasites per haemocyte) at 15 °C and analysed after 1h, 2h, 4h and 8h of contact. The control consisted of haemocytes alone suspended in FSW (5.10^5 cells mL⁻¹). The experiments were performed in duplicate using three different pools of oysters.

2.3 Flow cytometry analysis

For each sample, 5000 events were counted using an EPICS XL 4 (Beckman Coulter). Based on size discrimination, parasites or other small particles were not counted, only

haemocytes were taken into account for cell activity measures. Results were depicted as cell cytograms and reported in log scale fluorescence levels for each marker used. Fluorescence depended on the monitored parameters: non specific esterase activities, ROS production and phagocytosis were measured using green fluorescence while cell mortality was measured using red fluorescence. Protocol used for cells labelling have previously been described (Morga et al., 2009).

2.4 Light microscopy

One hundred μ l of cell suspensions were cytocentrifugated (100 \times g, 4 °C, 1 min), stained with Hemacolor® (Merck) and examined using light microscopy. For each time of contact, 150 haemocytes were observed.

2.5 Gene selection

Seven ESTs were selected from *Ostrea edulis* cDNA databases because of their potential involvement in response to infection with *Bonamia ostreae*. Among these genes, one encodes a cell signalling protein, the galectin (OeGal) and four are involved in post-phagocytosis degradation and cellular protection mechanisms: super oxide dismutase (Oe-SOD Cu/Zn), extracellular super oxide dismutase (Oe-EcSOD), cytochrome p450 (CYP450), omega glutathionne s transferase (OGST). The expression of two other genes implicated in defence mechanisms (lysozyme) and stress (heat shock protein 90, HSP90) was also studied.

2.6 RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from haemocytes using Trizol (Trizol® reagent, Invitrogen™) and treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) to remove remaining genomic DNA. RNA concentrations were measured before and after DNase treatment. Reverse transcription (RT) was carried out as previously described Morga et al., (in press) using the oligo(dT) anchor primer (5'-GAC CACGCGTATCGATGTCGACT(16)V-3'). Reverse transcriptase was performed using SuperScript III (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations.

2.7 Expression analysis of the selected ESTs by quantitative real-time PCR

For each of the selected ESTs, forward and reverse primers were designed using primer3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Table 1). Real-time quantitative PCR reactions were duplicated and performed in a total volume of 25 μ L using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Stratagene) in 96-microwell plates. Each well (25 μ L) contained 5 μ L of cDNA dilution (1/30), 12.5 μ L of Brilliant[®] SYBR[®] Green II PCR Master Mix (Stratagene), 2.5 μ L of each diluted primer (3 μ M) and 2.5 μ L of distilled water. Thermal cycling conditions were: 1 cycle of activation of Hot start Taq polymerase at 95 °C for 10 min; 40 cycles of amplification at 95°C for 10 s, 60°C for 30 s; and melting temperature curve analysis at 95°C to 60°C by 0.5°C decrease of the temperature every 10 s. In all cases, negative controls (without cDNA) were included to rule out DNA contamination.

For each candidate gene, melting curve and gel picture were analysed in order to verify the specificity of the amplified products and that a single PCR product was amplified. PCR efficacy (E) was calculated for each primer pair by determining the slopes of standard curves. These curves were generated using a serial dilutions analysis of plasmid containing the insert of interest. Amplification efficacies were calculated according to the following equation $E=10^{(1-slope)}$ (Pfaffl, 2001).

The expression of the candidate genes was normalized using the elongation factor 1 alpha (GenBank, accession n° EU651798) as housekeeping gene and haemocytes alone were used as calibrator. Primers are shown in Table 1. Fold units were calculated using the method described by Pfaffl (2001).

2.8 Identification and characterization of immune-related genes Oe-SOD Cu/Zn and Oe-EcSOD

In order to obtain the complete open reading frame (ORF) of Oe-SOD Cu/Zn and Oe-EcSOD, RACE reactions were carried out using SMART RACE cDNA Amplification Kit from Clontech according to the manufacturer's instructions. 5' and 3' primers were designed using primer 3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (3'Oe-SOD Cu/Zn TGATAACCTGGCTGGTCCACAGTC, 5'Oe-SOD Cu/Zn GACTGTGGACCAGCCAGGTTAATCA and 3'Oe-ECSOD

GTGCACATGGAGGTCATGTTGACTG, 5'Oe-ECSOD
TGACAGGATGGTCCTCTTCCTCCTC) and synthesized by Eurogentec. Race PCR products were cloned using TOPO Vector System (Invitrogen). Several clones were selected and amplified with TOPO R and F primer in order to control the size of the insert in the plasmid.

2.8.1 Sequencing and sequence analysis

Selected clones were first amplified using TempliPhi™ DNA Sequencing Template Amplification Kit (Amersham's). PCR products isolated from individual clones were sequenced in both ends with TOPO R and F primers (Table 1) with the sequencing kit ABI BigDye® terminator version 3.1 using an ABI PRISM® 3130 XL-Avant Genetic Analyzer, a 36 cm capillary array and POP 7 polymer. Chromatograms were analyzed with Chromas 231 software. Sequences were then analyzed with BlastX algorithm available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the EST sequences were then submitted to dbEST and GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Complete sequences (Oe-SOD and Oe-EcSOD) were deposited in GenBank and assigned under the accession numbers GU320695 and GU320696.

2.8.2 Phylogenic analysis of Oe-SOD Cu/Zn and Oe-EcSOD

The sequence of the complete ORF of Oe-SOD Cu/Zn was aligned with homologous genes from GenBank database (*Homo sapiens sapiens* NP000445.1, *Rattus norvegicus* CAA79925.1, *Bos taurus* NM174615, *Salmo salar* NP00111780.1, *Pagrus major* AA015363.1, *Drosophila melanogaster* P61851, *Mytilus edulis* CAE46443.1, *Crassostrea ariakensis* ABF14366.1 and *Crassostrea gigas* CAD42722.1).

The sequence of the complete ORF of Oe-EcSOD was aligned with homologous genes from GenBank database (*Homo sapiens sapiens* NP0003093.2, *Rattus norvegicus* CAA64149.1, *Bos taurus* NP001076079.1, *Salmo salar* NP001134324.1, *Perna canaliculus* AF273766.1, *Crassostrea virginica* BAF30874.1 *Crassostrea gigas* AAY60161.1 and *Saccostrea glomerata* ACQ73551.1).

Sequences were aligned using ClustalW (Thompson et al., 1997) from MEGA 4 (Tamura et al., 2007). A phylogenetic tree based on deduced amino acid sequences was constructed using the Neighbour-Joining (NJ) (Saitou et al., 1987) algorithm with the MEGA 4 software program. Statistical confidence on the inferred phylogenetic relationships was assessed by bootstrap of 5000 replicates.

2.9 Statistical analysis

A Mann-Whitney test was performed to test the difference between the mean numbers of parasites in infected haemocyte during the kinetic experiment. Flow cytometry results were expressed as percentages of positive cells. In order to detect an effect of tested conditions, an ANOVA was performed using XLSTAT-Pro® version 7.5.3 software. Values were converted into r angular arcsinus $\sqrt{\%}$ of positive cells) before analysis to ensure the respect of *a priori* assumptions of normality and homogeneity. In the case of rejection of H_0 , an *a posteriori* Tukey test was used to compare differences between means. Quantitative PCR results were analysed by ANOVA. ANOVA was performed using XLSTAT-Pro® version 7.5.3 software. In the case of rejection of H_0 , an *a posteriori* Tukey test was used to compare differences between means.

3. Results

3.1. Detection of parasites in haemocytes

Bonamia ostreae appeared engulfed by haemocytes whatever the tested contact period was. Percentages of infected haemocytes increased from 18% to 27% and mean number of parasites per infected haemocyte from 1.3 to 2.4 between 1h and 8h of contact, respectively (Fig. 1). The number of parasites observed inside the haemocyte was significantly more important at 4h and 8h compared to 1h ($p < 0,036$ and $p < 0,016$, respectively). Number of binucleated parasites inside the haemocytes increased after one hour of contact (Fig. 1). Moreover, two intrahaemocytic trinucleated parasites could be observed after 4h.

3.2 Flow cytometry analysis

3.2.1 Haemocyte mortality

Prior to haemocyte activity measurement, cell survival was checked by deducing cell mortality based on PI labelling. Whatever was the tested condition, percentage of live cells was never below 89,1%. Cell mortality was considered as equivalent between all tested conditions.

3.2.2 Non specific esterase activities

In the controls, percentages of positive haemocytes for non specific esterase activities were 76.3% \pm 4.2%, 71.6% \pm 5.8%, 75.5% \pm 4.5% and 72% \pm 3.6% at 1h, 2h, 4h and 8h, respectively. In presence of parasites, 44.8% \pm 17.8%, 44.1% \pm 8.1%, 39% \pm 12.7% and 53.8% \pm 16.2% of haemocytes were positive for esterase activities at the same times (Fig. 2).

In presence of parasites, the percentages of positive haemocytes showing esterase activities were significantly lower compared to the control after 1h ($p < 0.033$), 2h and 4h ($p < 0.004$) of *in vitro* infection.

3.2.3 ROS production

In the controls, percentages of ROS positive haemocytes were 85.6% \pm 6.5%, 76.4% \pm 2.2%, 72.6% \pm 15.3%, and 88.7% \pm 8.1% at 1h, 2h, 4h and 8h, respectively. In presence of parasites, the percentage of ROS positive cells were 60.3% \pm 1.7%, 62.3% \pm 3.7%, 62.6% \pm 17.9% and 70.2% \pm 1.1%, for the same times of *in vitro* infection (Fig. 3). Percentages of ROS positive haemocytes were significantly lower in presence of parasites than in controls at 1h, 2h and 4h ($p < 0.013$).

3.2.4 Phagocytosis assay

In the controls, the percentages of positive haemocytes (haemocytes which have engulfed 3 beads or more) were 70.2% \pm 7.8%, 73.5% \pm 5.3%, 59% \pm 20.8% and 68.8%

±0.4% after 1h, 2h, 4h and 8h of incubation, respectively. In presence of parasites, 77.5% ±12.5%, 46.8% ±4.9%, 38.4% ±16.6% and 43.5% ±23.6% of haemocytes were positive for phagocytosis after 1h, 2h 4h and 8h of *in vitro* infection, respectively (Fig. 4). A significant decrease of the percentage of positive cells was observed in haemocytes in contact with *Bonamia ostreae* after 2h of contact ($p < 0.02$).

3.3 Identification and characterization of immune-related genes

3.3.1 *Ostrea edulis* Super Oxide Dismutase (Oe-SOD Cu/Zn)

RACE-PCR reactions allowed obtaining the full cDNA sequence of *O. edulis* Super Oxide Dismutase Cu/Zn (Oe-SOD Cu/Zn). This sequence of 898 nucleotides contains a short 5'-untranslated region (1-48 nt) followed by an ORF of 471 nucleotides (49-519 nt) and finished by a 3'-untranslated region (520-898 nt) showing a polyadenylation signal (AATAAA) starting 79 bp upstream from the polyA tail (Fig 5). The deduced amino acid sequence presented a molecular mass of 15 863.70 Da and a predicted isoelectric point of 5.93 (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). SignalP analysis further confirmed that Oe-SOD Cu/Zn was a cytoplasmic protein. The deduced amino acid sequence was devoid of signal peptide.

Multiple alignments of intracellular SOD identified in different invertebrate and vertebrate species revealed the presence of several conserved motifs and SOD signature sequences in Oe-SOD Cu/Zn (Fig. 6). Two cysteine residues (C⁶⁰ and C¹⁴⁹), involved in the formation of internal disulfide bond were fully conserved in Oe-SOD Cu/Zn. Four histidine residues (H⁵⁰, H⁵², H⁶⁶, and H¹²³) predicated to be critical for copper (Cu) binding, and highly consistent with other invertebrate or vertebrate SODs, were conserved in Oe-SOD Cu/Zn (Fig. 5). Moreover, four residues involved in Zinc (Zn) binding, notably three histidine (H⁶⁶, H⁷⁴, H⁸³) and one aspartate (D⁸⁶), were also identified in Oe-SOD Cu/Zn. Additionally, two Cu/Zn-SOD family signature sequences (GFHVHQFGDNT and GNAGGRLACGVI) appeared the highest conserved regions according to multiple alignments.

The alignment (using ClustalW) of the selected Cu/Zn SOD sequences showed that *Ostrea edulis* Cu/Zn SOD clustered with other bivalve Cu/Zn SOD (Fig. 6), with the

highest homologies to Cu/Zn SOD from the *Crassostrea ariakensis* (85% identity) and Cu/Zn SOD from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (84% identity) (Fig. 6).

3.3.2 *Ostrea edulis* Extracellular Super Oxide Dismutase Oe-EcSOD

RACE-PCR reactions allowed obtaining the full cDNA of *Ostrea edulis* Extracellular Super Oxide Dismutase (Oe-EcSOD). Oe-EcSOD showed a 985 nucleotide sequence containing a short 5'-untranslated region (1-42 nt) followed by an ORF of 794 nt (43-837 nt) and finished by a 3'-untranslated region (838-985 nt) (Fig 7). The deduced amino acid sequence of the ORF region showed a predicted molecular mass of 29 478.38 Da and an isoelectric point of 4.93 (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Analysis of the deduced amino acid sequence using the SignalP3.0 software (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) revealed the presence of a putative signal peptide of 20 amino acids (MQSLILVLAALFYVA), suggesting that Oe-EcSOD can be secreted. The mature peptide contained a putative N-glycosylation site (NLS⁴¹) (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/), suggesting that Oe-EcSOD is a glycoprotein (Fig. 7).

The alignment of extracellular Cu/Zn SOD sequences of different species showed that Oe-EcSOD is closest to other bivalve EcSODs (Fig. 8), notably to Dominin from the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (42% identity), Carvortin from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (42% identity), and EcSOD from *Saccostrea glomerata* (38% identity).

3.3.3 Phylogenetic analysis of both *Ostrea edulis* SOD

The phylogenic tree based on amino acid sequences of Oe-SOD and Oe-EcSOD from different species showed that Oe-SOD and Oe-EcSOD belong to the "mollusc cluster" (Fig. 9). The phylogenic tree showed two distinct groups including the cytoplasmic SOD sequences and the extracellular SOD sequences. In the extracellular SOD group, "mollusc species" formed a unique branch including *Perna canaliculus*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas* and *Saccostrea glomerata*.

3.4 Expression patterns of genes selected

At 1h of *in vitro* infection, Oe-Gal was significantly ($p < 0.01$) over expressed (3.9) and its expression slowly decreased afterwards. A significant over expression of OGST ($p < 0.02$) was observed at 1h (2.1) while it appears stable after that time. The lysosyme gene was significantly ($p < 0.01$) over expressed at 1h, 2h and 4h with a maximum expression at 2h (4.1). The CYP450 expression was significantly ($p < 0.01$) up regulated at 1h (2.3) and 8h (2.5). Oe-SOD was significantly ($p < 0.006$ and 0.001) over expressed at 2h (1.9) and 4h (1.4). Oe-EcSOD was down regulated at 1h and not significantly regulated at 2h, 4h and 8h. Finally, HSP 90 was not significantly regulated during the course of the experiment (Fig. 10).

4. Discussion

The present work aimed at better understanding interactions between flat oyster *Ostrea edulis* haemocytes and the parasite *Bonamia ostreae*. Cellular and molecular responses were measured by photonic microscopy, flow cytometry and real time PCR assays at different times post incubation: 1h, 2h, 4h and 8h.

In vitro infection was performed at the ratio of five parasites per haemocyte at 15°C. The internalization of the parasite by the haemocytes was monitored by examination of cytocentrifugated cells.

Parasites were observed inside haemocytes as soon as 1h of infection. Previous studies have demonstrated that *Bonamia ostreae* was internalized after 30 min of contact with haemocytes and was not degraded after phagocytosis (Chagot et al., 1992 ; Mourton et al., 1992). Percentages of infected haemocytes increased during the course of the experiment. Due to the difficulty to identify with certainty haemocyte types for some cytocentrifugated cells, we did not compare percentages of infected haemocytes considering cell types. However, all types of haemocytes (granulocytes, small and large hyalinocytes) were found infected as it was previously observed in several studies (Chagot, 1989 ; Cochenne et al., 2003). The mean number of parasites observed inside the infected haemocytes was significantly higher after 4h and 8h compared to 1h. This result suggests that the parasite multiplies inside the haemocytes, or that the parasites accumulate within a

particular cell during the time course of the experiment. Binucleated and trinucleated parasites were observed inside haemocytes suggesting that the multiplication of the parasite rapidly occurs after the internalization.

Haemocyte activities were monitored by flow cytometry according to protocols previously described (Morga et al., 2009). Haemocyte mortality never exceeded 89.1% during the experiment. The internalization of the parasite did not induce haemocyte death even after 8h of contact. Similar results were obtained in a previous study after 2h of incubation (Morga et al., 2009).

Non specific esterase activities were recognized as reflecting the global activity of haemocytes. Esterases may also be involved in degradation of internalised particles after phagocytosis. In the present study, parasites induced a decrease of the percentage of esterase positive cells after one hour and more significantly after two and four hours of contact. These results, in addition to the lack of haemocyte mortality, suggest a direct impact of parasites on host cell esterase activities. Catalytic enzymes present in *Bonamia ostreae* (Hervio et al., 1991) might be able to inhibit hydrolases (ie esterases) produced by haemocytes.

Similarly, the percentage of ROS positive haemocytes was lower after 1h, 2 h, 4h and 8h of incubation with parasites compared to the control. As no cell mortality was detected, parasites may have a direct impact on haemocyte ROS production. The inhibition of oxygen radical production has already been described and should facilitate intracellular survival of protozoan parasites including *Trypanosoma sp* (Penketh et al., 1987), *Toxoplasma sp* (Murray et al., 1980, Shrestha et al., 2006), *Leishmania sp* (Murray, 1981), *Bonamia ostreae* (Morga et al., 2009) and *Perkinsus marinus* (Volety and Chu, 1997).

Perkinsus marinus and rickettsia-like organisms possess acid phosphatase, partly responsible for the suppression or inhibition of ROS production (Le Gall et al., 1991 ; Volety and Chu 1997). Hervio et al., (1991) demonstrated the presence of acid phosphatase activity in haplosporosomes of *Bonamia ostreae*. Acid phosphatase can inactivate the production of NAD(P)H oxidase and thus prevents ROS production. The level of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* is equivalent (Hervio et al., 1991) to levels found in several *Leishmania* species (Lovelace and Gottlieb, 1987) in which the inhibitor role of the NAD(P)H oxidase has been shown.

Bead phagocytosis capacity of haemocytes was significantly lower after 2 hours in presence of *Bonamia ostreae* compared to haemocytes alone. Cyto centrifugation observation revealed an increase of the parasite number inside infected haemocytes between 1 and 2 hours post infection. The decrease of bead phagocytosis capacity by infected haemocytes observed 2 hours after parasite contact could be due to the presence of parasite inside haemocytes. Goedken et al., (2005) have shown that the internalisation of the parasite *Perkinsus marinus* by haemocytes from the oyster *Crassostrea virginica* did not induce a difference of bead internalisation by haemocytes. The decrease of bead phagocytosis capacity and the increase of infected haemocytes during the course of the experiment support the hypothesis that the parasite *B. ostreae* mediates its own phagocytosis.

In addition to this cellular analysis of haemocytes response to an infection with the parasite *Bonamia ostreae*, some genes have been selected for their potential interest to better understand host parasite interactions.

Galectins are able to bind glycans present at the surface of micro organisms and favour their entrance of the pathogens inside host cells (Tasumi and Vasta, 2007). In the present study the expression level of Oe-Gal was highly up regulated at 1h and slightly up regulated at 2h. This result suggests the participation of oyster galectin to the parasite internalization process facilitating its binding to the host cell surface.

The expression level of the lysozyme gene appeared up regulated in haemocytes after 1, 2 and 4h of contact with the parasite. Similar results were observed in *Mercenaria mercenaria* infected with the parasite QPX (Quahog parasite X) (Perrigault et al., 2009). Lysozyme is a lysosomal enzyme with an important defence role as it can hydrolyse bacterial components. *Ostrea edulis* lysozyme was previously identified by Matsumoto et al., (2006). Lysozyme activity has been detected in the body fluids and tissues of many bivalve molluscs and is believed to play a role in host defence and digestion (Takahashi et al., 1986, Cronin et al., 2001). Lysozyme concentrations were unchanged in clams *Ruditapes decussatus* infected by *Perkinsus atlanticus* (Ordás et al., 2000) and in oysters *Crassostrea virginica* infected by *Perkinsus marinus* (Chu et al., 1993). However, a subsequent investigation in oysters showed a slight decrease in lysozyme concentration in *Perkinsus marinus* infected oysters (La Peyre et al., 1995).

Four genes involved in degradation and cellular protection (OGST CYP450, Oe-SOD Cu/Zn and Oe-EcSOD), were also studied by real time PCR. CYP450 and OGST were up regulated after 1h of infection. This result can be related to parasite internalization and the production of toxic components produced by the haemocyte and the parasite. Indeed, glutathione S-transferases play an important role in the detoxification of toxic compounds of endogenous and exogenous origin (Brophy and Pritchard, 1992 ; Brophy and Pritchard, 1994) and cytochrome p450 is involved in various functions notably oxidative metabolism. Cytochrome p450 has been studied in other bivalves subjected to parasite challenges (Tanguy et al., 2004, Perrigault et al., 2009). Perrigault et al., (2009) reported an up regulation of this gene after 14 days post QPX infection with in *Mercenaria mercenaria*.

Two genes (Oe-SOD Cu/Zn, Oe-EcSOD) involved in the oxidative stress were completely characterized and their expression levels were studied. Oe-SOD Cu/Zn homologous genes have been recently characterized in other oyster species including *Crassostrea gigas* (Huvet et al., 2004) and *Crassostrea virginica* (Tanguy et al., 2004). Oe-EcSOD appeared similar to the permin or cavortin previously identified in other bivalve species such as *Perna canaliculus*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* (Scotti et al., 2001 ; Scotti et al., 2007). Surprisingly, these two genes presented a different expression pattern during the experiment. The cytoplasmic SOD appeared slightly up regulated after 2h and 4h while the extracellular SOD was down regulated after 1h and not significantly modulated at 2h, 4h and 8h. The down regulation observed after 1h of contact could be induced by the parasite in order to facilitate its own internalization and to escape degradation before internalization. The EC-SOD in *Saccostrea glomerata* was found up regulated in *Marteilia sydneyi* resistant oyster (Green et al., 2009). Cytoplasmic SOD up regulation might reflect the cell response to parasite internalization. ROS production showed a decrease after 1h, 2h and 4h. Decrease of ROS production could be related to the up regulation of the cytoplasmic SOD at 2h and 4h of haemocyte incubation with the parasite.

The present work is the first study combining cellular and molecular approaches to investigate the interactions between haemocytes from *Ostrea edulis* and the parasite *Bonamia ostreae*. Results showed internalisation of the parasite after 1h of contact and an increase of the number of the parasites observed inside infected

haemocytes during the time course of the experiment suggesting a multiplication of the parasite especially after 2h of contact. Flow cytometry revealed a general decrease of esterase activities, ROS production and phagocytosis capacity in infected cells. Real time PCR measures showed an up regulation of some genes potentially involved in the entrance of the parasite within host cells (e.g. Oe-Gal) or involved in the detoxification and degradation like lysozyme or cytochrome P450. Such results contribute to better understand how the flat oyster reacts against the infection with *Bonamia ostreae* and how the parasite may escape these mechanisms.

Acknowledgement

The authors are very grateful to anonymous reviewers for revising the manuscript. The Région of Poitou Charentes supported in part this research. The authors thank Raphael Brizard for technical assistance for the maintenance of oysters in Ifremer La Tremblade quarantine facilities.

References

- Auffret M., 1985. Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial, Thèse De 3^{ème} Cycle Université De Bretagne Occidentale.
- Bachère E., Hervio D., Mialhe E., 1991. Luminol dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org.* 11, 173-180.
- Bachere E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149-168.
- Brophy P.M. and Pritchard D.I., 1992. Metabolism of lipid peroxidation products by the gastrointestinal nematodes *Necator americanus*, *Ancylostoma ceylanicum* and *Heligmosomoides polygyrus*. *Int J Parasitol.* 22, 1009-1012.
- Brophy P.M. and Pritchard D.I., 1994. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno and chemotherapy. *Exp Parasitol.* 79, 89-96.
- Carnegie R.B., Barber B.J., Culloty S.C., Figueras A.J., Distel D.L., 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Dis Aquat Org.* 42, 199-206.
- Cavalier-Smith T. and Chao E.E., 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist.* 154, 341-358.
- Chagot D., 1989. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Acestospora). Thèse EPHE Sciences de la vie et de la terre, Université de Montpellier. 151.
- Chagot D., Boulo V., Hervio D., Mialhe E., Bachere E., C. Mourton, Grizel H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): entry mechanisms. *J Invertebr Pathol.* 59, 241-249.
- Cheng T.C., 1981. *Invertebrate blood Cells*, Academic Press of London.
- Cochennec N., Le Roux F., Berthe F., Gerard A., 2000. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J Invertebr Pathol.* 76, 26-32. Chu F.-L.E., La Peyre J.F., Burreson C.S., 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defense related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*—Salinity effects. *J Invertebr Pathol.* 62, 226-232.
- Cochennec-Laureau N., Auffret M., Renault T., Langlade A., 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *J Invertebr Pathol.* 83, 23-30.
- Cronin M.A., Culloty S.C., Mulcahy M.F., 2001. Lysozyme activity and protein concentration in the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 11, 611-622.
- D'Argenio D.A., Gallagher L.A., Berg C.A., Manoil C., 2001. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Bacteriol.* 183, 1466-1471.
- Dermine J.-F. and Desjardins M., 1999. Survival of intracellular pathogens within macrophages. *Protoplasma* 210, 11-24.
- Fisher S.W., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In: M. Brehélin, Editor, *Immunity in invertebrates*. 25-35.
- Gravato-Nobre M.J. and Hodgkin J., 2005. *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. *Cell. Microbiol.* 7, 741-751.
- Green T.J., Tom J., Dixon T.J., Devic E., Adlard R.D. Barnes A.C., 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 799-810.
- Goedken M., Morsey B., Sunila., de Guise S., 2005. Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanism by *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 24, 487-496.
- Hahn B.R. and Bayne C.J., 2001. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. *J Parasitol.* 87, 292-299.

- Hervio D., Chagot D., Godin P., Grizel H., Mialhe E., 1991. Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Ascetospora), an intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Dis Aquat Org.* 11, 67-70.
- Humphries J.E. and Yoshino T.P., 2008. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol.* 32, 554-562.
- Huvet A., Herpin A., Lionel D., Labreuche Y., Samain J.-F., Cunningham C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene.* 343, 211-220.
- La Peyre J.F., Chu F.-L.E., Meyers J.M., 1995. Hemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 179-190.
- Le Gall G., Mialhe E., Chagot D., Grizel H., 1991. Epizootiological study of rickettsiosis of the Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*. *Dis Aquat Org.* 10, 139-145.
- Lovelace J.K. and Gottlieb M., 1987. Effect of tunicamycin on the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 22, 19-28.
- Matsumoto T., Nakamura A.M., Takahashi K.G., 2006. Cloning of cDNA and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Bio.* 145, 325-330
- Mialhe E., Bachere E., Chagot D., Grizel H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture.* 71, 293-299.
- Morga B., Arzul I., Chollet B., Renault T., 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 836-842.
- Morga B., Arzul I., Faury N., Renault T., in press. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish Shellfish Immunol.*
- Mourton C., Boulo V., Chagot D., Hervio D., Bachere E., Mialhe E., Grizel H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): *in vitro* system establishment. *J Invertebr Pathol.* 59, 235-240.
- Murray H.W., Nathan C.F., Cohn Z.A., 1980. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. *J Exp Med.* 152, 1610-1624.
- Murray H.W., 1981. Susceptibility of leishmania to oxygen intermediate and killing by normal macrophage. *J Exp Med.* 153, 1302-1315.
- Olafsen J.A., Fletcher T.C., Grant P.T., 1992. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 123-138.
- Ordás M.C., Novoa B., Faisal M., McLaughlin S., Figueras A., 2001. Proteolytic activity of cultured *Pseudoperkinsus tapetis* extracellular products. *Comp Biochem and Physiol B Biochem Mol Biol.* 130, 199-206.
- Penketh P.G., Kennedy W.P.K., Patton C.L., Sartorelli A.C., 1987. Trypanosomatid hydrogen peroxide metabolism. *FEBS Lett.* 221, 427-431.
- Perrigault M., Tanguy A., Allam B., 2009. Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX). *BMC Genomics.* 10, 377-387.
- Pfall MW., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29, 2002-2007.
- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., Rabouin M.A., 1979. Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Rev Trav Inst Pêches Marit.* 43, 131-140.
- Saitou N. and Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4, 406-425.
- Schott E.J., Pecher W.T., Okafor F., Vasta G.R., 2003. The protistan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. *Exp Parasitol.* 105, 232-240.
- Scotti P.D., Dearing S.C., Greenwood D.R., Newcomb R.D., 2001. Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Bivalvia: Mytilidae). *Comp Biochem Phys.* 128B, 767-779.

- Scotti P.D., Dearing S.C., Greenwood D.R., 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zeal J Mar Freshwater Res.* 41, 91-101.
- Shrestha S.P., Tomita T., Weiss L.M., Orlofsky A., 2006. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. *Int J Parasitol.* 36, 433-441.
- Takahashi K., Mori K., Nomura T., 1986. Occurrence and characterization of lysozyme in the marine bivalves. *Nippon Suisan Gakkai Shi.* 52, 863-868.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24, 1596-1599.
- Tanguy A., Guo X., Ford S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Gene.* 338, 121-131.
- Tasumi S. and Vasta GR., 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *J Immunol.* 179, 3086-3098.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Toreilles J., Guerin M.C., Roch P., 1996. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *CR Acad Sci Paris, série III; science de la vie* 319, 209-218.
- Volety A.K. and Chu F.-L.E., 1997. Acid phosphatase activity in *Perkinsus marinus*, the protistan parasite of the American oyster, *Crassostrea Virginica*. *J Parasitol.* 83, 1093-1098.
- Xue Q.-G., Renault T., Chilmoneczyk S., 2001. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 557-567.
- Xue Q.-G., Schey K.L., Volety A.K., Chu F.-L.E., La Peyre J.F., 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*), *Comp. Biochem. Physiol. B.* 139, 11-25.

Figure captions

Figure 1 Mean of the parasite observed inside haemocytes and number of binucleate cells observed inside the haemocytes.

Figure 2 Percentages of positive haemocytes for non specific esterase activities after 1h, 2 h, 4h and 8h of incubation with parasites at 5:1 ratio. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. * indicate the significant differences of positive cells compared to the control

Figure 3 Percentages of positive haemocytes for ROS production after 1h, 2 h, 4h and 8h of incubation with parasites at 5:1 ratio. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. * indicate the significant differences of positive cells compared to the control

Figure 4 Percentages of positive haemocytes for phagocytosis after 1h, 2 h, 4h and 8h of incubation with parasites at 5:1 ratio. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. * indicate the significant differences of positive cells compared to the control

Figure 5 Complete ORF nucleotide and deduced amino acid sequences of the flat oyster *Oe-SOD Cu/Zn*. ORF contains some conserved (boxed) amino acids (C⁶⁰, C¹⁴⁹, H⁵⁰, H⁵², H⁶⁶, H⁶⁶, H⁷⁴, H⁸³ and H¹²³ and D⁸⁶) and signature (surrounded) amino acids (GFHVHQFGDNT and GNAGGRLACGVI).

Figure 6 Alignment of *Ostrea edulis*, *Crassostrea ariakensis* and *C. gigas* SOD Cu/Zn protein sequences. Aa identities are highlighted in black.

Figure 7 Complete ORF nucleotide and deduced amino acid sequences of the flat oyster *Oe-EcSOD*. ORF contains a signal peptide (MQSLILVLAALFYVA²⁰) and a glycosylation site (NLS⁴¹) boxed and surrounded respectively on the sequence. The polyadenylation signal (AATAAA) is underlined in grey.

Figure 8 Alignment of *Ostrea edulis*, *Crassostrea virginica*, *C. gigas* and *Saccostrea glomerata* extracellular SOD protein sequences. Aa identities are highlighted in black.

Figure 9 Neighbour-joining tree showing phylogenetic analysis of both SOD (cytoplasmic and extracellular) amino acid sequences from various species. The tree is based on 1000 bootstrap replications. The scale for branch length (0.1 substitutions/site) is shown below the tree.

Figure 10 Relative expression by quantitative PCR of selected genes (Hsp 90, CYP450, o-GST, Oe-SOD Cu/Zn, Oe-EcSOD, Oegal and Lysozyme) after 1h, 2h, 4h and 8h of incubation with *Bonamia ostreae*. Expression levels were normalized to EF1- α and presented as relative expression to controls (mean \pm SD, n = 2). * indicates significant differences of gene expression compared to controls.

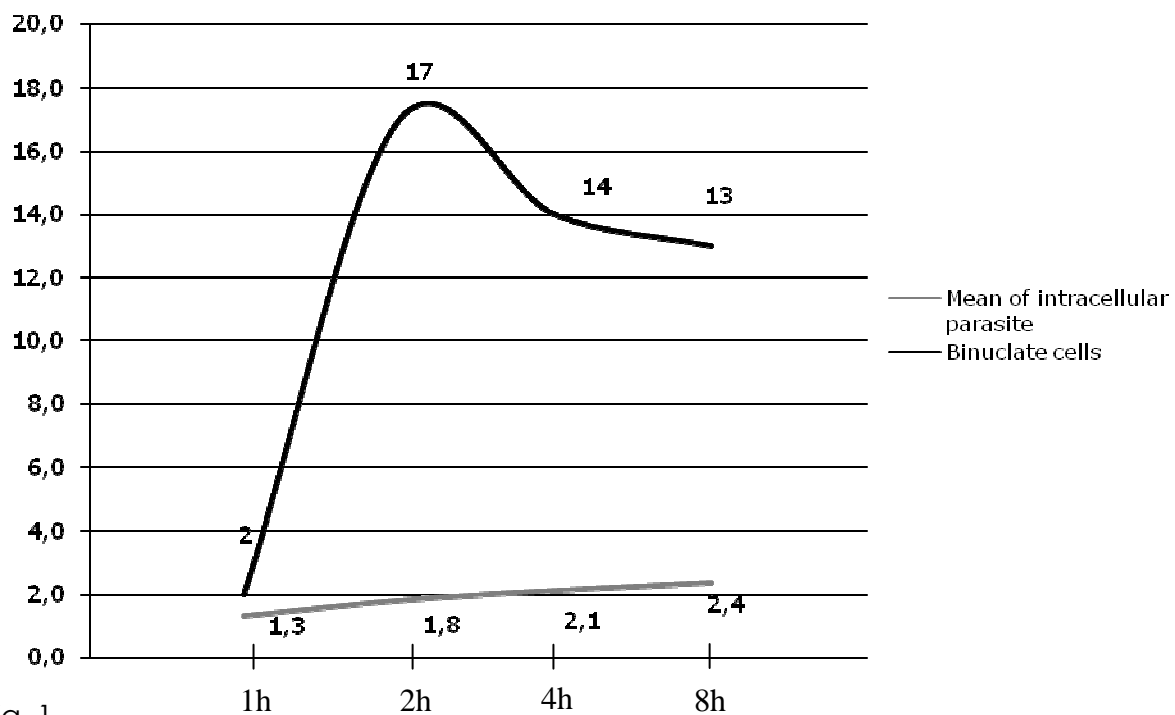


Fig. 1

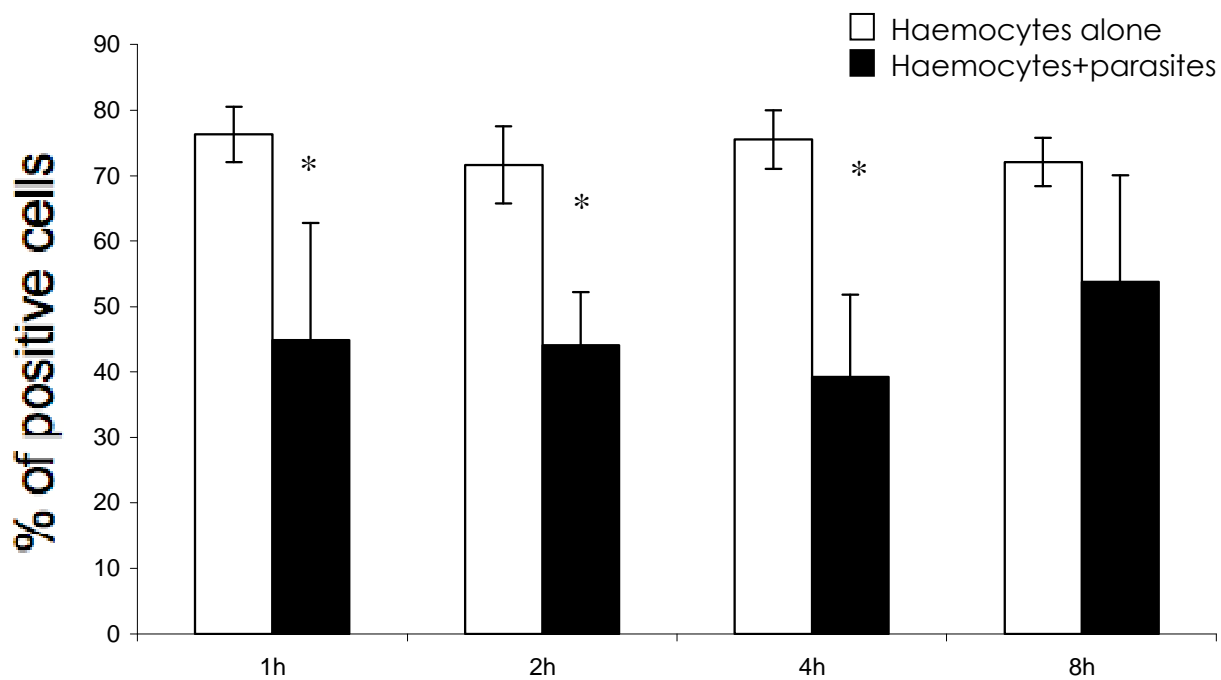


Fig. 2

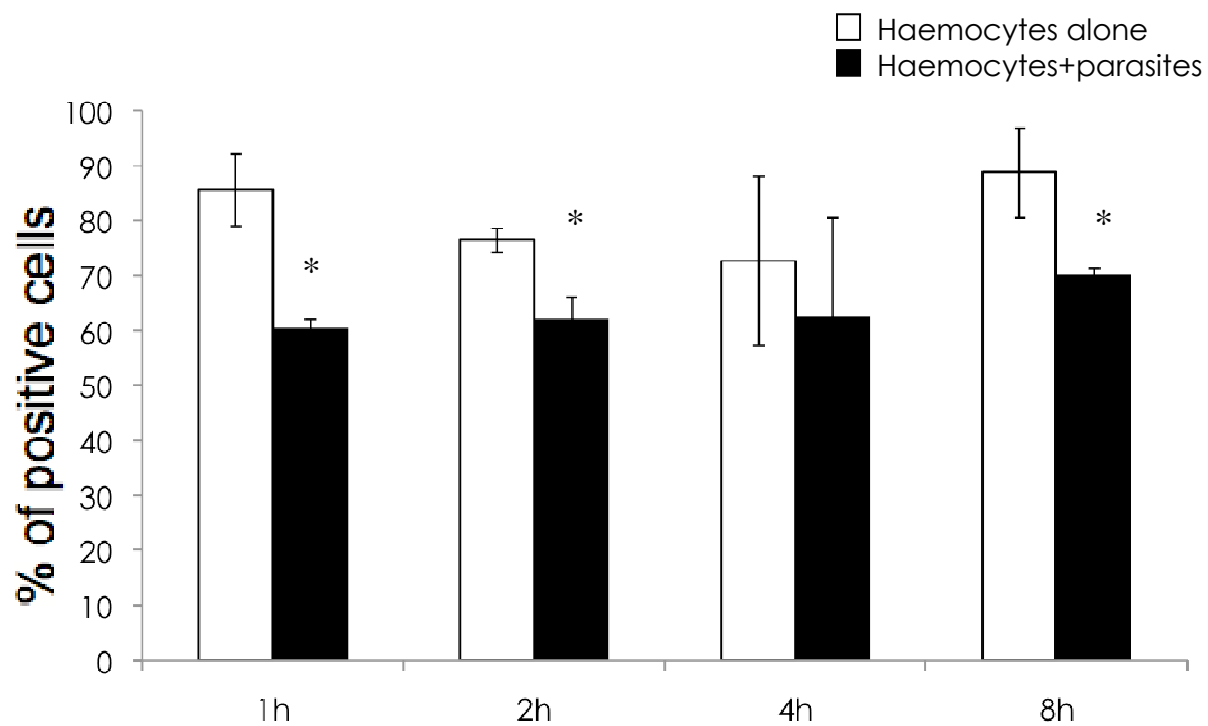


Fig. 3

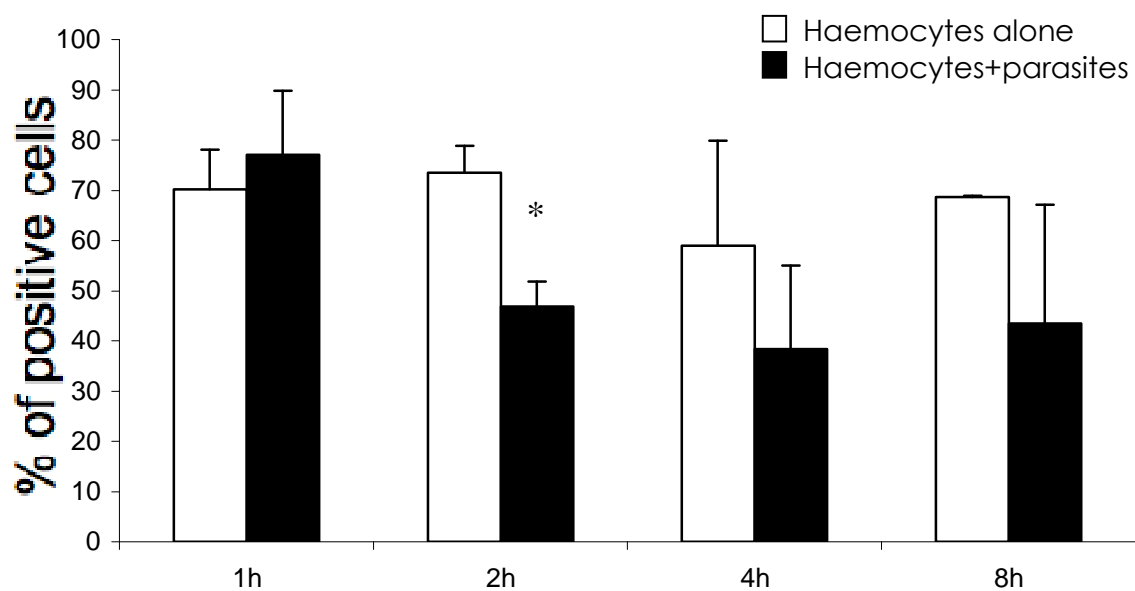


Fig. 4

```

10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AA GAA AAAAA TTTGCTGTA CTCGCCGGCGTGT TTA GCAAA GA TTCA CTA TGTCCGCA TTA AA GGCTGTCTGTGTA CTGAA 80
                                     M S A L K A V C V L K

90      100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGGTGCAGATAA CA GTGTTA CAGGAA CA GTGCA CTTT AGTCAA GAGGCA TCA GGTT CCCCCGTGA CTCTTA CTGGGGAGA 160
G A D N S V T G T V H F S Q E A S G S F V T L T G E

170     180     190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCA GTGGGTTGGCA CCA GGA CAA CA TGGATTCCA TGTTCA TCA GTTTGGGA GA CAA CA CCAA TGTTTGTATCA GTGCTGGA 240
I S G L A P G Q H G F H V H Q F G D N T N G C I S A G

250     260     270     280     290     300     310     320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCTCA CTTTAA TCCCTTTAA CAAAGAA CA CGGAGCA CCGGAGGA TA CAGA CAGA CA TGTTGGGGA CCTGGGAAA TGTTGG 320
A H F N P F N K E H G A P E D T D R H V G D L G N V G

330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGCTGGTGA GGA TGGAA TTGCCAAA GTCAA CATTACAGA CAAAA TGA TTA CCTGGCTGGTCCA CAGTCTATTA TTGGGA 400
A G E D G I A K V N I T D K M I N L A G P Q S I I G

410     420     430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAA CTA TGGTGA TTCA CGCTGA CA TTGA CGA TCTTGGAAAA GGA GGTCA TGAA CTCA GCAAGA CGA CTGGTAA TGCTGGT 480
R T M V I H A D I D D L G K G G H E L S K T T G N A G

490     500     510     520     530     540     550     560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGA CGTTTGGCTTGTGGA GTGA TTGGGA TCA CCAA GTAAA CA TTGCCA TTCTA CAAA CTCGGCTAA TTCAA TGA TCCGT 560
G R L A C G V I G I T K

570     580     590     600     610     620     630     640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A CCA CCCTGTTA GGA TTTTGTGTTGTT CGTCA GGTTCA TA GTGA TTGTTTCAA GTCTCCA TGAA TGTCA TTA A TTA AAA T 640

650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAA TCA CTGTA TA CTTGAAA GA TCA CATA GTTCTGTCTTCTTGTA CTTTGGTATT CGGTGCA GTGAAA TGA TA TCTTCA T 720

730     740     750     760     770     780     790     800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CATGTCTA CGA TCTATTA TTGTGA TGCTTCA TGA CA TTGA TTA A TTA AAA TTTAA CAA TTGTAGTC ████████ TCTA TGT T 800

810     820     830     840     850     860     870     880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAA TGA CA TAA TA GTA CAA TGTA TTTGA TCA TAA TAA TTA TGAAA TA TTTAAAA AAAAAA CAAAA CTTT CGAAAA AAAAA 880

890
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 898

```

Fig. 5

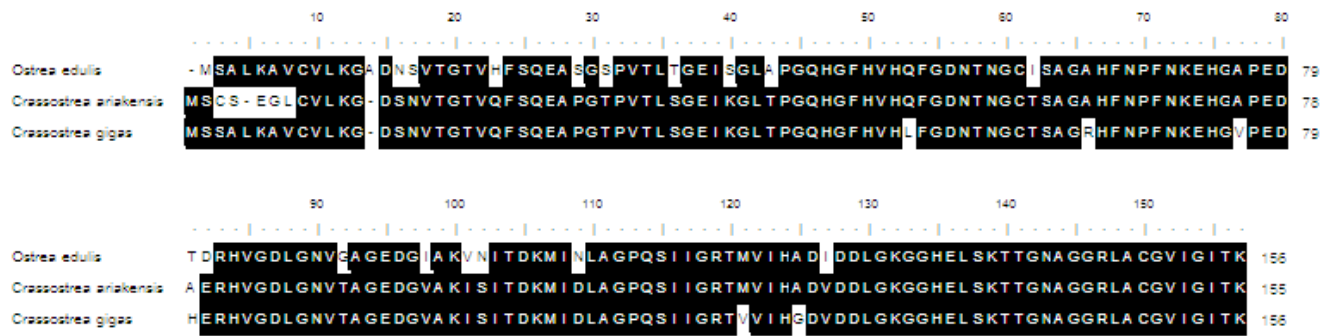


Fig. 6

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTTCTTTGCGCTGAA TTTCTGGTCAA CA CCGTGGTAGGAA CGA TGCA GTCTCTAA TCA TTTTGGTCTGGCGGCTCTGTT 80
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      M Q S L I I L V L A A L F
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      90      100     110     120     130     140     150     160
TTA CGTGGCCCTGGA CCGGCTGTA GATTGTA GTCA GGGAGA CA TTTCTCA TCTCCA GA CGAGGTGAA CTTTCTGAAAG 160
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      Y V A P G R A V D C S Q G D I S H L Q D E V N F L K
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      170     180     190     200     210     220     230     240
CGAA CCTGTCTGCGGTGTGGGA GAAA CTCCA CGAGGA TGA CATCA GA GATGGA GCGGTTT CCGCGGA GGA GGA A GA GGA C 240
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      A N L S A V W E K L H E D D I R D G A V S A E E E E D
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      250     260     270     280     290     300     310     320
CA TCCTGTCAAAA GCGTTGT CAGGGAAA CCA GAAA TCA CAGGGTGAA CCTAGA CTTCTA TTTGGA TATA CCCGA CCA CCC 320
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      H P V K S V V R E T R N H R V N L D F Y L D I F D H P
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      330     340     350     360     370     380     390     400
CA CA CCA CA CAA GCGGA GGA AAA TCA CGCTGTCCA GA CA CCTGA CGA TCA CGA GA TGCA TTA TGCTCA CTGCGA GA TGG 400
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      T P H K A E E N H A V Q T P D D H E M H Y A H C E M
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450     460     470     480
AA CCAAA CA CCA CCTGGT CAGTTA TCTTCA CCA CAAA GTCCA CGGCA GCA TTCA CA TGGTGCA GGA GGA CA CCGGGA C 480
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      E P N T H L V S Y L H H K V H G S I H M V Q E G H G D
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490     500     510     520     530     540     550     560
GTGCA CATGGA GGTCA TGTGTA CTGGTTTCAA CA CTA GTGA GGA CTT CGCCA GCCA CCA TCA CCGGCTTCA CATGCA CGA 560
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      V H M E V M L T G F N T S E D F A S H H H G L H M H E
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      570     580     590     600     610     620     630     640
GTA CGGA GA TTTGT CGGA GGGGTGTGGA TCTGT CGGA GAA CTTTA CCA CAA TGAA CA CGCCCCA GA CCA TGCTAA CCCTG 640
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      Y G D L S E G C G S V G E L Y H N E H A F D H A N P
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      650     660     670     680     690     700     710     720
GTGA TCTTGA GA TGTGGTTGA CGA CATGAA TGGTAA CGTCAA CGCCAA CTTAA CCTTCA CTGGTTTCA GA TCGGATG 720
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      G D L G D V V D D M N G N V N A N L T F D W F Q I G L
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730     740     750     760     770     780     790     800
GCTGA TGGCA TCCTA GGGCGCTCTCTA GTGTTTCTCCA AGGCGA CCA TAA CCA GGAA CAAA GTGAA CA GA TAGCCTGCTG 800
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      A D G I L G R S L V F L Q G D H N Q E Q S E Q I A C C
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      810     820     830     840     850     860     870     880
CA TTA TCGGCCGTGCGA GCGTA TCA GA CCA CCA CTA GAGGT CGCCA CAAA GTTCA TCCA TCA CTGTCTCTCTGAA CCGAA 880
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      I I G R A S V S D H H
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      890     900     910     920     930     940     950     960
AGTAGCCATCCTAGTTAAAAAGAGTGCA TTTGTTCTGTTGTA TTTCTTCA TTAAAGTAGAGGA GA TAA CCTA CCTAAAAA 960
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      970     980
      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 988
  
```

Fig. 7



Fig. 8

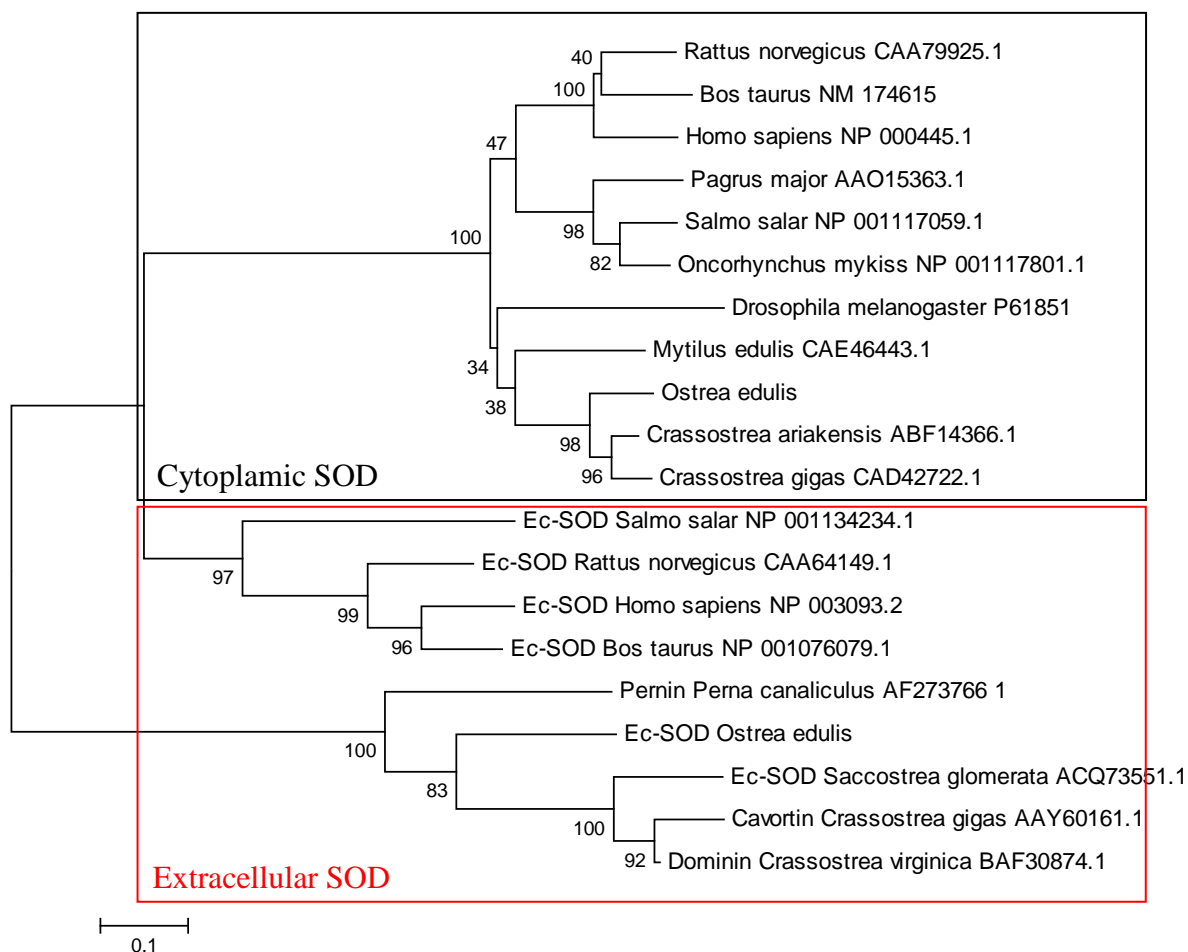


Fig. 9

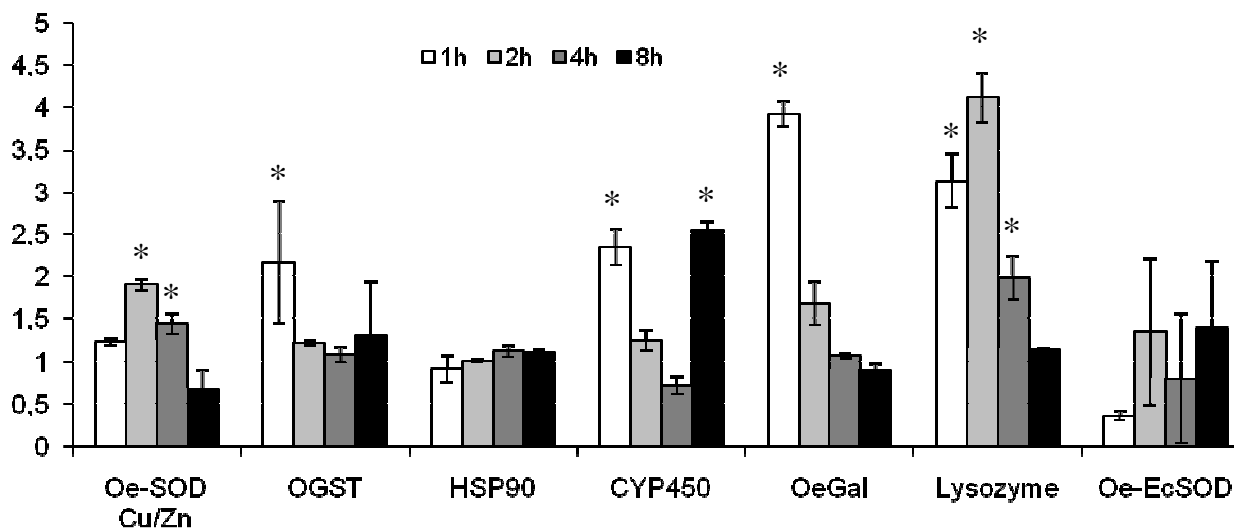


Fig. 10

| Name | Oligonucleotide sequence (5'-3') | Concentration of Forward primer (μ M) | Concentration of Reverse primer (μ M) |
|-------------|--|--|--|
| OGST | Forward: GGTCGTCAGGGGTCAGTTT Reverse: GGTCCCGTCTTGAGCA | 3 | 3 |
| CYTOP450 | Forward:GTCATCAAGCGAATGCGATA Reverse: GGAGAGCTCCCTCATTTC | 3 | 3 |
| Hsp90 | Forward: TTTGTGGAACGGGTCAAAA Reverse:AACGTCGAGCACAGTCGAG | 3 | 3 |
| OeGal | Forward: TCGGAGGTCGCCCTTAAT Reverse: TTGCCGTGAACAATCAACA | 3 | 3 |
| Lysozyme | Forward: TTGGAAATACCCGCAGGA Reverse: ATATCGGACGCCTGCTTG | 3 | 3 |
| Oe-EcSOD | Forward:GAGGAGGAAGAGGACCATCC Reverse: ATTTTCCTCCGCTTTGTGTG | 2,5 | 2,5 |
| Oe-SOD | Forward: TCGTCAATGTCAGCGTGAA Reverse: AAATGTTGGGGCTGGTGA | 3 | 3 |
| ElongPCRQ5m | Forward: GTCGCTCACAGAAGCTGTACC Reverse: CCAGGGTGGTCAAGATGAT | 3 | 3 |
| Topo F | GACCATGATTACGCCAAGC | | |
| Topo R | CCCAGTCACGACGTTG | | |

Table 1 Combinations of primers used in quantitative PCR assays

III Comparaison de la réponse cellulaire et moléculaire de deux groupes d'huîtres plates suite à des infections expérimentales : quelles bases pour la résistance à la bonamiose ?

L'identification préalable de gènes d'intérêt, le développement de PCR en temps réel et la mise au point de protocole d'analyse en cytométrie en flux ont permis de comparer les réponses moléculaires et cellulaires de deux groupes d'huîtres à l'infection par *Bonamia ostreae*. Des huîtres sélectionnées pour leur résistance à la bonamiose et des huîtres « sauvages » ont ainsi été infectées expérimentalement par injection de suspension parasitaire et par cohabitation.

L'infection expérimentale par injection a fait l'objet de six prélèvements d'huîtres à 12h, 3, 5, 8, 15 et 30 jours après injection. Les réponses cellulaires et moléculaires ont été mesurées chez les huîtres injectées avec le parasite en les comparant aux huîtres injectées avec de l'eau de mer filtrée. Les analyses en cytométrie en flux et en PCR en temps réel ont été réalisées sur des pools d'hémolymphe de dix huîtres par condition. De plus, la détection du parasite a été réalisée sur chaque individu prélevé.

L'infection expérimentale par cohabitation s'est déroulée sur une période de six mois. Des huîtres résistantes et sensibles ont été placées en cohabitation avec des huîtres plates issues du milieu naturel injectées avec du parasite afin de créer une source de parasites dans les bacs. Trois prélèvements ont été réalisés respectivement à quatre, cinq et six mois. L'observation des appositions de tissus cardiaques a permis de classer les huîtres en deux groupes, infectées et non infectées. Des pools d'hémolymphe ont ainsi été constitués et analysés en cytométrie en flux et PCR en temps réel.

Le suivi de la réponse cellulaire en cytométrie en flux a montré une diminution de la phagocytose chez les hémocytes résistants infectés. Le suivi de l'expression des

gènes sélectionnés a permis d'observer une modulation des gènes impliqués dans l'apoptose en présence du parasite *Bonamia ostreae* chez les hémocytes résistants et sensibles.

Article n° 6 : *Ostrea edulis* responses following *in vivo* experimental infection with the parasite *Bonamia ostreae*.

(Pour soumission International Journal for Parasitology)

Benjamin Morga, Tristan Renault, Nicole Faury, Sophie Lerond, Celine Garcia, Jean-Pierre Joly, Bruno Chollet, Maeva Robert, Emmanuelle Omes, Sylvie Lapègue, Estelle Harrang and Isabelle Arzul*.

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer);
Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP); La Tremblade, France

Corresponding author. Mailing address: IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France. Phone: +33 5 46 76 26 10. Fax: +33 5 46 76 26 11. E-mail: iarzul@ifremer.fr

Abstract

Bonamiosis due to the parasite *Bonamia ostreae* has been associated with massive mortality outbreaks in flat oyster stocks in Europe. Control of the disease currently relies on disease management practices and transfer restriction. Previously, selection based on bonamiosis survival have been applied to produce flat oyster families with resistant progeny.

In order to study the molecular and cellular responses of flat oyster against the parasite *Bonamia ostreae*, two oyster populations were selected as representing resistant oyster and wild-type oysters. Responses of these populations were tested during two experimental infections performed by injection and cohabitation, respectively. Responses of resistant and wild oysters after experimental infection were analysed by flow cytometry and real time PCR. Cellular responses including, non-specific esterases detection ROS production and phagocytosis activity were analysis by flow cytometry. Four genes homologous to genes previously shown to be involved in immunity were selected (Inhibitor of apoptosis OelAP, Fas ligand OeFas-ligand, cytoplasmic superoxyde dismutase Oe-SOD and extracellular superoxyde dismutase OeEc-SOD) and monitored by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) in order to study the molecular responses.

Flow cytometry results allowed detecting a decrease of phagocytosis in resistant haemocytes during both experimental infections. The expression of the inhibitor of apoptosis (OelAP) gene and OeFas-ligand gene was significantly increased in resistant oysters at 5 days post injection. OelAP gene expression appeared significantly increased in wild-type oysters at 8 days post injection. The expression of OeEc-SOD gene is down regulated in resistant oysters in both experimental trials. It was hypothesised that resistant oysters would be able to generate an anti-parasitic response through apoptosis.

Key words: *Bonamia ostreae*, Protozoan, *Ostrea edulis*, Resistance, Experimental infection, Haemocytes, Gene expression, Apoptosis.

1. Introduction

The European flat oyster *Ostrea edulis* is a species endemic to European and North African coasts and is found from Norway to Morocco as well as in the whole Mediterranean and Black seas (Jaziri, 1985). European production of *O. edulis* has shown a drastic decline from about 30 000 tons in 1961 to less than 2 000 t nowadays in France (FAO 2009). This decrease was mainly due to the rapid spread and high impact of two parasitic diseases, due to *Marteilia refringens* and *Bonamia ostreae*. The parasite *Bonamia ostreae* was first described in 1979 by Pichot et al., (1979) in French Brittany. *Bonamia ostreae* is an intracellular protozoan affiliated to the order of haplosporidia and to the phylum of cercozoan (Cavalier-Smith and Chao, 2003). The disease has been correlated with haemocyte destruction and haemocyte infiltration of the connective tissue of the gills, mantle and digestive gland related to the proliferation of *B. ostreae* (Balouet et al., 1983 ; Cochenec-Laureau et al., 2003). Mortalities are mainly observed in two-years old oysters (Culloty and Mulcahy, 1996) although younger individuals (0 to 1 year more) have been shown to be susceptible to the infection (Lynch et al., 2005 Lallias et al., 2008).

Although methods for *in vitro* cultivation of the parasite are lacking, a protocol for parasite purification from infected oysters (Mialhe et al., 1988) enables *in vitro* and *in vivo* studies on interactions between *B. ostreae* and its host cells, the haemocytes (Mourton et al., 1992). This protocol has notably allowed implementing experimental infection trials by injecting the parasite into flat oysters (Mialhe et al., 1988 ; Martin et al., 1993 ; Hervio et al., 1995 ; Culloty et al., 1999 ; Lallias et al., 2008 ; Lynch et al., 2010) or by cohabiting source oysters injected with a known number of cells of *B. ostreae* and naïve oysters (Culloty et al., 1999; Lallias et al., 2008 ; Lynch et al., 2010). Selective breeding programs were initiated in France and Ireland, with the main objective of producing flat oysters resistant to bonamiosis (Naciri-Graven et al., 1998, Culloty et al., 2004; Lapègue et al., 2004). In France, genetic selection was applied through inoculation tests and field testing, the surviving oysters being used as breeders to produce the next generation (Naciri-Graven et al., 1998). As a result, different selected families have been produced in Ifemer's facilities (La Tremblade, Charente Maritime, France) and showed enhanced survival and lower prevalence of the parasite compared with control wild-type oysters in *B. ostreae*-contaminated areas (Lapègue et al., 2004).

The flat oyster *Ostrea edulis* and its parasite *Bonamia ostreae* represent a suitable model to study host-pathogen interactions, notably because of the possibility to reproduce the bonamiosis, in *in vitro* assays (Mourton et al., 1992). Development of *in vitro* infections has allowed obtaining some information concerning the interaction between oyster haemocytes and *B. ostreae*. Some studies demonstrated that the parasite *B. ostreae* was internalised after 30 min of contact with haemocytes and was not degraded after phagocytosis (Chagot et al., 1992 ; Mourton et al., 1992). Hervio et al., (1991), reported that the parasite possesses catalytic enzymes and acid phosphatase which could inhibit haemocyte activities. Intracellular parasites have developed sophisticated strategies to escape host defence mechanisms, thereby finding unique niches where they can survive, and from which they can establish successful infections. Recently *in vitro* infections were performed in order to study the cellular and molecular responses of haemocytes from selected and wild-type flat oyster *Ostrea edulis* against the parasite *B. ostreae* (Morga et al unpublished data). *In vitro* infections allowed to identify cellular activities related to the parasitic infections by flow cytometry (Morga et al., 2009). Moreover, the identification of some genes characterized by SSH contributed to better understand the immune response of *Ostrea edulis* against the intracellular parasite (Morga et al unpublished data). However, the knowledge of the cellular and molecular responses in resistant oysters are poorly studied. Cochenec, (2001) has identified some differences in the composition the haemolymph between resistant and wild-type oyster. Recently, a transcriptomic approach performed by (Morga et al., unpublished data) allowed identifying some candidate genes involved in resistance or susceptibility to bonamiosis. The identification of these genes was performed through *in vitro* infection trials. In Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, Green et al., (2009) identified some candidate genes involved in resistance against the parasite *Marteilia sydneyi*.

In this context, the description of the interaction between haemocytes (from resistant and wild-type oysters) and the parasite *Bonamia ostreae* through *in vivo* trials appears necessary in order to complete the previous data obtained during *in vitro* infection assays.

The aim of the present study was to undertake two types of challenge experiment (injection and cohabitation) using two different groups (resistant oysters and wild-

type oysters). Oysters used in both experimental infection trials were analysed by flow cytometry and by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) in order to monitor cellular and molecular responses of both groups of flat oysters.

2. Material and methods

2.1. Biological material

2.1.1. Oysters

Eighteen month old (n=600) and 24 -month old (n=250) flat oysters *Ostrea edulis* were collected from Quiberon Bay (Southern Brittany, France), a bonamiosis endemic zone, and were acclimatized in Ifremer's facilities (La Tremblade, Charente Maritime, France) over 30 days. These oysters are considered as the wild-type population .

The resistant oysters were obtained from the progenitor identified in a previous program of selection. Flat oysters were produced in the Ifremer's hatchery from Argenton (Brittany, France). Then, 18 month old oysters were acclimatized in Ifremer's facilities in La Tremblade (Charente Maritime, France) over 30 days.

Flat oysters were maintained in 120 l raceways supplied with a constant flow of seawater 150L h⁻¹ enriched in phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracialis* and *Tetraselmis succica*).

2.1.2. Haemolymph collection

Haemolymph was withdrawn from the adductor muscle sinus of oysters using a 1 ml syringe equipped with a needle (0.40 mm × 90 mm). To eliminate debris the haemolymph samples were filtered through 60 µm nylon mesh and hold on ice to prevent cell aggregation. The volume of haemolymph collected from each oyster was approximately 1 ml. Haemolymph samples were pooled and haemocytes counted using a Malassez-cell.

2.1.3. Parasite purification

Bonamia ostreae was purified according to the protocol developed by Mialhe et al., (1988). Briefly, heavily infected oysters were selected by examination of heart tissue imprints using light microscopy. After homogenisation of all the organs except the adductor muscle, parasites were concentrated by differential centrifugation on sucrose gradients and then purified by isopycnic centrifugation on a Percoll gradient. Finally, the purified *B. ostreae* cells were suspended in FSW and counted using a Malassez-cell.

2.2 Experimental infection

2.2.1 Experimental infection by injection

The experimental design consisted of 12 tanks (6 for resistant oysters and 6 for wild-type oysters) containing 60 oysters each. Purified parasites (2.2×10^5 per individual) were injected into 180 resistant oysters and 180 wild-type oysters. The same amount of oysters was injected with 100 μ L of filtered sea water (FSW). Injection was performed into the heart cavity of the oysters after anaesthesia using $MgCl_2$ (200g/l). Flat oysters were maintained in 120 l tank supplied with a constant flow of seawater $150L\ h^{-1}$ enriched in phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracialis* and *Tetraselmis succica*).

Ten oysters were collected from each tank 12h, 3, 5, 8, 15 and 30 days after infection. Haemolymph was withdrawn from each oyster and hemolymph samples (10) were pooled for each tank and each collecting date. A piece of gills was sampled from each oyster in order to check the presence and to quantify the parasite by real time PCR.

2.2.2 Experimental infection by cohabitation

Our experimental design consisted of 4 tanks, 2 tanks containing 100 resistant oysters each and 2 tanks containing 100 wild-type oysters each. Cohabitation was performed between 100 challenged oysters and 50 experimentally infected oysters per tank. These oysters were previously infected by injection of 1×10^6 purified

parasites per oyster as previously described.

The experiment lasted 6 month after the first contact. During the challenge, oyster mortality was checked daily and dead oysters were analysed by tissue imprint. Twenty five challenged oysters were collected from each tank after 4 and 5 months of cohabitation. Remaining oysters were sacrificed after 6 months Haemolymph was withdrawn from each oyster and maintained on ice. Infection status was established by heart imprint and haemolymph samples were pooled according to the type of oysters (resistant/wild-type) and the status of the oysters (infected or non infected). Pools of haemolymph were analysed by flow cytometry and real time PCR.

2.3 Detection of *Bonamia ostreae*

2.3.1 Heart imprint

Mortality was checked daily during the time of the experiment performed in cohabitation. A heart imprint was performed on each gaping oyster that consisted of dissecting out the ventricle, drying it on paper and then performing several imprints on a slide. After air drying for 2 min, the slide was then stained with Hemacolor (Merck). Slides were observed under a light microscope and the level of infection by the parasite was characterized according to Hervio et al., (1995) into the following categories: – negative results (B0-) when no parasite was detected after 5 min of screening heart imprints from an individual oyster, – low infections (B0+) when 5 or fewer parasites were observed during 5 min screening – moderate infections (B0++) when around one parasite per microscopic field of view was detected, – heavy infections (B0+++) when several or numerous parasites were observed in each microscopic field of view.

2.3.2 DNA extraction

Gill tissue (25 mg) was collected from each oyster for DNA extraction using a QiaAmp DNA Mini-kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted and suspended in 50 µL of sterile, deionised water and then diluted to a final concentration of 5 ng µL⁻¹ for real-time PCR analysis.

2.3.3 Real time PCR for *Bonamia ostreae* detection

Quantitative PCR was performed using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Stratagene) according to a previously published protocol (Robert et al., 2009). Ct values were calculated as averages of the three replicates or duplicates within each reaction. Quantitative standards (serial dilution of plasmid DNA) and no template controls (NTC = deionised, sterile water) controls were included in each PCR run.

2.4 Haemocyte responses: cellular and molecular of analyses

2.4.1 Flow cytometry

Cell mortality, non specific esterase activities, ROS production and fluorescent bead phagocytosis were measured by flow cytometry using an EPICS XL 4 (Beckman Coulter) according to previously published protocols (Morga et al., 2009).

2.4.2 Quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR)

For each of the selected genes, forward and reverse primers were designed using primer3 software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Table 1). Real-time quantitative PCR reactions were duplicated and performed in a total volume of 25 μ L using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Stratagene) in 96-microwell plates. Each well (25 μ L) contained 5 μ L of cDNA dilution (1/30), 12.5 μ L of Brilliant[®] SYBR[®] Green II PCR Master Mix (Stratagene), 2.5 μ L of each diluted primer (3 μ M) and 2.5 μ L of distilled water. Thermal cycling conditions were: 1 cycle of activation of Hot start Taq polymerase at 95 °C for 10 min; 40 cycles of amplification at 95°C for 10 s, 60°C for 30 s; and melting temperature curve analysis at 95°C to 60°C by 0.5°C decrease of the temperature every 10 s. In all cases, negative controls (without cDNA) were included to rule out DNA contamination.

For each candidate gene, melting curve and gel picture were analysed in order to verify the specificity of the amplified products and that at a single PCR product was amplified. PCR efficacy (E) was calculated for each primer pair by determining the slopes of standard curves. These curves were generated using a serial dilutions

analysis of plasmid containing the insert of interest. Amplification efficacies were calculated according to the following equation $E=10^{(1-\text{slope})}$ Pfaffl (2001).

The expression of the candidate genes was normalized using the elongation factor 1 alpha (EU651798, Table 1) as housekeeping gene. For the injection trial, haemocyte RNA extracted from parasite or FSW injected oysters collected at 12h were used as calibrator. For cohabitation experiment, the calibrators are pools of free parasite in resistant and wild oysters. Fold units were calculated using the method described by Pfaffl (2001).

2.5 Statistical analysis

Flow cytometry results were expressed as percentage of positive cells. In order to detect an effect of tested conditions, an ANOVA was performed using XLSTAT-Pro® version 7.5.3 software. Values were converted into r angular arcsinus $\sqrt{\text{\% of positive cells}}$ before analysis to ensure the respect of a priori assumptions of normality and homogeneity. In the case of rejection of H_0 , an a posteriori Tukey test was used to compare differences between means.

Real time PCR results were analysed using ANOVA test. ANOVA was performed using XLSTAT-Pro® version 7.5.3 software. In the case of rejection of H_0 , an a posteriori Tukey test was used to compare differences between means

3. Results

3.1 Experimental infection by injection

3.1.1 Detection of *Bonamia ostreae*

The real time PCR has allowed to detect and quantify the presence of *Bonamia ostreae* in the flat oyster challenged. Three days post injection we have detected more infected oysters in wild-type (8/20 oysters analysed) population than in resistant population (3/20 oysters analysed). At the end of the experiment wild oyster population present more infected oyster (11/20 oysters analysed) than the resistant oyster population (6/20 oysters analysed) (Fig. 1).

3.1.2 Flow cytometry

The haemocyte mortality did not show variation during the experimental infection between all the tested conditions.

Wild-type infected oysters showed higher non specific esterase activities ($p < 0.0001$) than control ones after 30 days post injection (Fig. 2). These oysters also showed higher ROS production than controls after 5 days ($p < 0.016$) of injection.

Resistant infected flat oysters produced less ROS than control ones after 8 days of injection ($p < 0.014$) (Fig. 3).

Generally, fluorescent bead phagocytosis was lower in resistant infected oysters compared with controls (significant differences at 12 hours ($p < 0.037$) and 5 days ($p < 0.037$)). On the contrary, wild-type infected oysters showed higher fluorescent bead phagocytosis than controls, no significant difference was observed compared to wild oyster injected with the FSW (Fig. 4).

3.1.3 Oyster gene expression

Resistant infected oysters showed a significant up regulation ($p < 0.0001$) of Oe-IAP and Oe-Fas ligand gene expression, especially 5 days post injection while controls displayed a down regulation of these genes (Fig. 5). The expression of SOD gene appeared down regulated in infected and control resistant oysters after 3 and 8 days of injection, respectively (Fig. 5). Ec-SOD appeared significantly down regulated in resistant infected oysters after 5 and 30 days ($p < 0.0001$) of injection and did not present significant modulation in controls (Fig. 5).

In wild-type flat oysters injected with the parasite the expression of OeFas ligand, OeSOD and OeEc-SOD genes appeared down regulated. The OeFas-ligand gene expression is significantly down regulated ($p < 0.005$) after 5, 30 days ($p < 0.006$) (Fig. 6). The OeSOD and OeEc-SOD gene expression was significantly down regulated at 3, 5 days (OeSOD) and 30 days (OeEc-SOD) ($p < 0.0001$) post injection (Fig. 6). The expression level of the OeIAP was significant up regulated ($p < 0.025$) after 8 days in wild-type flat oysters injected with the parasite and significantly down regulated after 3 and 5 days ($p < 0.0001$). The analysis of the expression levels of the OeEc-SOD and the OeSOD showed a significant up regulation of these genes 15 days and 30 days post injection ($p < 0.0001$) respectively (Fig. 6).

3.2 Experimental infection by cohabitation

3.2.1 Infection monitoring

Cumulative mortality for both groups of oysters is presented in Fig. 7. Resistant oysters showed less mortality than wild-type ones. At the end of the experiment, a total of 56 wild-type oysters and 35 resistant oysters were found dead.

Oysters were collected at 3 different times to maximize chance to obtain oysters with different infection status. Whatever were the collection time and the oyster type (resistant or wild-type), infected oysters could be obtained (Table 2).

At the end of the experiment, 16 % of the tested resistant oysters were found infected and 25% of wild-type tested oysters.

3.2.2 Flow cytometry results

The analysis of the haemocyte activities during the experimental infection by cohabitation showed a significant decrease ($p < 0.005$) of fluorescent bead phagocytosis in infected resistant flat oysters compared to non infected ones (Fig. 8). Non specific esterase activities and ROS production did not present significant difference between tested conditions (Fig. 9 and 10).

3.2.3 Gene expression results

A significant over expression of Oe-Fas ligand ($p < 0.0001$) gene was observed in infected resistant and wild-type oysters (Fig. 11 and 12). The expression of Oe-EcSOD gene was significantly down regulated in infected resistant oysters ($p < 0.0001$) (Fig. 11).

4. Discussion

In this study, we have performed two types of experimental infections (injection of purified parasites and cohabitation with experimentally infected oysters) in order to investigate the response of two groups of flat oysters (resistant and wild-type) to the

parasite *Bonamia ostreae*.

The experimental infections by injection of purified parasites have been widely used for studies on the parasite or in the context of a French selective breeding program for resistance to bonamiosis. This method induced a high percentage of mortality associated with a high prevalence of the parasite (Tigé and Grizel 1984 ; Elston et al., 1986 ; Mialhe et al., 1988 ; Naciri-Graven et al., 1998). Injection of purified parasites creates stress and tissue lesions, and might bypass the natural pathway of entry of the parasite into the oysters. The main advantage of the parasite injection is that all the tested oysters are injected with a same known amount of parasites and subjected to the same infection pressure.

Cohabitation mimics the natural pathway of transmission of the disease. In our study, we cohabited challenged oysters with oysters previously infected by injection of purified parasites (Lallias et al., 2008). These experimentally infected oysters were used as the source of parasites in order to maintain a high parasite pressure during the course of the experiment. Most cohabitation experiments performed so far did not involve the injection of purified parasites in the source oysters (Elston et al., 1986 ; Elston et al., 1987 ; Martin et al., 1993 ; Culloty et al., 1999).

In both types of experimental infections we performed, resistant flat oysters displayed lower mortality and parasite detection frequency than wild-type oysters.

Moreover, differences could be observed between the response of resistant and wild-type oysters to the infection with the parasite. Fluorescent bead phagocytosis was mostly lower in resistant infected oysters compared to non infected ones whatever was the type of experiment we conducted. No significant difference was observed between wild-type infected and control (wild-type noninfected oysters) except after 15 days in the injection experiment where infected oysters showed higher phagocytosis activity than controls. A previous work demonstrated a decrease of phagocytosis after two hours of a *in vitro* infection (Morga et al unpublished data). Phagocytosis allows the degradation of the parasites but also contributes to the establishment of the infection with *Bonamia ostreae*, an intrahaemocytic protozoan. By decreasing their phagocytosis activity resistant oysters might be able to mitigate the development of the disease.

Non specific esterases activities did not show significant differences between tested conditions except in wild-type oysters 30 days post injection. Indeed, at this time, infected oysters showed higher esterase activities than controls, which could be

related to the development of the infection and the host response.

Tested conditions did not affect ROS production during the cohabitation experiment. The injection experiment allowed to observe some differences between infected and non infected oysters. Wild-type infected oysters seemed to produce more ROS between 3 and 5 days post injection while resistant infected oysters produced less ROS, especially at 8 days and 30 days post infection. Less ROS productions could be due to a diminution of the cellular damage.

Expression levels of four genes were monitored during the experimental infections. Among the four selected genes, two genes are related to the respiratory burst (OeSOD and OeEc-SOD) and the two other genes belong to the apoptosis pathway (Oe-Fas ligand and OelAP)

OeSOD and OeEc-SOD are involved in the generation of the ROS during the respiratory burst. SOD (cytoplasmic or extracellular) is known to be involved in the oxidative stress response. SOD enzymes are involved in detoxification and allowed to destroy the O_2^- . The O_2^- are very toxic for pathogen agents and haemocytes.

The expression of OeEc-SOD gene appeared down regulated in resistant infected oysters as shown by results obtained in the cohabitation experiment. The expression of this gene seemed to decrease after 5 days of injection and could be related to the decrease in ROS production and the lower phagocytosis activity generally observed in resistant infected oysters. In a previous work, the expression of the EC-SOD gene in *Saccostrea glomerata* was found up regulated in *Marteilia sydneyi* resistant oyster but in this case the parasite is extracellular and could explained the difference of results (Green et al., 2009). In wild-type oyster the expression of OeSOD gene appeared down regulated after 3 and 5 days and up regulated after 8 days. This result suggests an inhibition by the parasite at the beginning of the experiment. Moreover the expression of the OeEc-SOD gene is significantly up regulated after 15 days post injection and significantly down regulated at 30 days.

Fas is a type I transmembrane glycoprotein that mediates apoptosis and its biological ligand (Fas ligand) induces apoptosis through the binding to Fas antigens (Curtin and Cotter, 2003). OelAP contains a BIR domain essential for the anti-apoptotic properties of the IAPs (Deveraux et al., 1997, Roy et al., 1997). Apoptosis is a common physiological process that eliminates unwanted or diseased cells, and it plays important roles in embryogenesis, homeostasis, metamorphosis and immunity (Vaux and Korsmeyer, 1990 ; Steller and Grether, 1994 ; Zhang et al., 2005,

The expression level of Oe-Fas ligand gene was up regulated all along the experiment in resistant infected oysters. The expression of the Oe-IAP gene was generally down regulated in non infected and infected resistant oysters except at 5 days post injection in the infected group. These results suggest a higher apoptosis activity in resistant oysters especially in presence of the parasite. Molestina et al., 2003 have demonstrated that the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* is able to induce anti-apoptotic genes in the host in order to survive inside the host. In wild oyster injected with the parasite the expression of OeIAP gene appeared significantly up regulated after 8 days post injection.

In the context of the cohabitation experiment, the expression of the OeFas-ligand gene appeared up regulated in all infected oysters compared to non infected ones whatever was the oyster type. This up regulation might reflect the response of the flat oyster in general to an infection with *Bonamia ostreae*.

Through two types of experimental infections, this study brought new information concerning the interactions between the flat oyster *Ostrea edulis* and the parasite *Bonamia ostreae*. Decrease of phagocytosis activity and modulation of apoptosis induced by the parasite and/or by the oyster appear as two of the key mechanisms supporting resistance and susceptibility to bonamiosis. These results give new perspectives in the understanding and the management of the disease by providing parameters that could be monitored when selecting oysters.

Acknowledgement

The Région of Poitou Charentes supported in part this research. The authors thank Raphael Brizard for technical assistance for the maintenance of oysters in IFREMER La Tremblade quarantine facilities.

References

- Balouet G., Poder J., Cahour A., 1983, Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 34, 1-14.
- Cavalier-Smith T. and Chao E.E., 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*. 143, 341-358.
- Chagot D., Boulo V., Hervio D., Mialhe E., Bachere E., Mourton C., Grizel H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *J. Invertebr. Pathol.* 5, 241-249.
- Cochennec-Laureau N., Auffret M., Renault T., Langlade A., 2003, Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 23-30.
- Cochennec N. (2001). *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*: sa position taxonomique parmi les parasites du groupe "microcell", analyses des interactions hôtes/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse de Doctorat Universitaire en Biologie cellulaire, Université de La Rochelle, 211pp.
- Culloty S.C., Mulcahy M.F., 1996, Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture* 144, 53-63.
- Culloty S.C., Novoa B., Pernas M., Longshaw M., Mulcahy M.F., Feist S.W., Figueras A., 1999, Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Org.* 37, 73-80.
- Culloty S.C., Cronin M.A., Mulcahy M.F., 2004, Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237, 41-58.
- Curtin J.F. and Cotter T.G., 2003. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.* 15, 983-992.
- Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C., 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 388, 300-304.
- Elston R.A., Farley C.A., Kent M.L., 1986. Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Org.* 2, 49-54
- Elston R.A., Kent M.L., Wilkinson M.T., 1987, Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 64, 237-242
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009, FishStat, <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>.
- Green T.J., Tom J., Dixon T.J., Devic E., Adlard R.D. Barnes A.C., 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 799-810.
- Hervio D., Bachère E., Boulo V., Cochennec N., Vuillemin V., Le Coguiç Y., Cailletaux G., Mazurie J., Mialhe E., 1995. Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture* 132, 183-194
- Hervio D., Chagot D., Godin P., Grizel H., Mialhe E., 1991. Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Ascetospora), an intrahaemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Dis Aquat Org.* 11, 67-70.
- Jaziri H. (1985). Biogéographie et polymorphisme enzymatique chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. 1758. Mémoire de DEA, USTL Montpellier. 40pp.
- Lallias D., Isabelle Arzul I., Heurtebise S., Ferrand S., Chollet B., Robert M., Beaumont A.R., Boudry P., Morga B., Lapègue S., 2008. *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquat. Living Resour.* 21, 423-439.
- Lapègue S., Bédier E., Goyard E., Dégremont L., Baud J.-P., Gérard A., Gouletquer P., Boudry P., 2004. Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole: l'exemple de l'ostréiculture. In: Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Actes Colloq. IFREMER 38, 113-121.

- Lynch S.A., Armitage D.V., Wylde S., Mulcahy M.F., Culloty S.C., 2005. The susceptibility of young, prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. J. Shellfish Res. 24, 1019–1025.
- Lynch S.A., Abollo E., Ramilo A., Cao A., Culloty S.C., Villalba A., 2010. Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. Parasitology. 14, 1-12.
- Martin A.-G., Gérard A., Cochenec N., Langlade A., 1993. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of the resistance of a first selected generation. In: Barnabé G., Kestemont P. (Eds.), Production, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture 1992. Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ. No. 18, pp. 547–554.
- Mialhe E., Bachère E., Chagot D., Grizel H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture 71, 293–299.
- Molestina R.E., Payne T.M., Coppens I., Sinai A.P., 2003. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. J Cell Sci. 116, 4359-71.
- Morga B., Arzul I., Chollet B., Renault T., 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. Fish Shellfish Immunol. 26, 836-842.
- Mourton C., Boulo V., Chagot D., Hervio D., Bachere E., Mialhe E., Grizel H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): *in vitro* system establishment. J. Invertebr Pathol. 59, 235-240.
- Naciri-Graven Y., Martin A.-G., Baud J.-P., Renault T., Gérard A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 224, 91-107.
- Pfall MW., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acid Res. 29, 2002-2007.
- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., Rabouin M.A., 1979. Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 43, 131-140
- Robert M., Garcia C., Chollet B., Lopez-Flores I., Ferrand S., François C., Joly J.-P., Arzul I., 2009. Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. Mol Cell Probes. 23, 264-71.
- Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C., 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. EMBO J. 16, 6914-6925.
- Steller H. and Grether M.E, 1994. Programmed cell death in *Drosophila*. Neuron 13, 1269-1274.
- Tigé G., Grizel H., 1984. Essai de contamination d'*Ostrea edulis* Linné par *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1979) en rivière de Crach (Morbihan). Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 328, 3-13.
- Vaux D.L. and Korsmeyer S.J., 1990. Cell death in development. Cell 96, 245-254.
- Zhang A., Wu Y., Lai H.W.L., Yew D.T., 2005. Apoptosis – a brief review, Neuroembryology. 3, 47-59.

Figure captions

Figure 1 Histogram representing the mean number of positive oyster by pools in resistant oyster population and in wild oyster population.

Figure 2 Percentage of haemocytes positive for non specific esterase activity during the experimental infection by injection. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. (RIBO: Resistant oysters injected with *Bonamia ostreae*, RIFSW: Resistant oysters injected with filter salt sea water, WIBO: Wild oysters injected with *Bonamia ostreae*, WIFSW: Wild oysters injected with filter salt sea water). * indicate significant difference for WIBO compared to WIFSW

Figure 3 Percentage of haemocytes positive for ROS during the experimental infection by injection. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. (RIBO: Resistant oysters injected with *Bonamia ostreae*, RIFSW: Resistant oysters injected with filter salt sea water, WIBO: Wild oysters injected with *Bonamia ostreae*, WIFSW: Wild oysters injected with filter salt sea water). * indicate significant difference for WIBO compared to WIFSW or FIBO compared to RIFSW.

Figure 4 Percentage of haemocytes positive for phagocytosis during the experimental infection by injection. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. (RIBO: Resistant oysters injected with *Bonamia ostreae*, RIFSW: Resistant oysters injected with filter salt sea water, WIBO: Wild oysters injected with *Bonamia ostreae*, WIFSW: Wild oysters injected with filter salt sea water). * indicate significant difference for WIBO compared to WIFSW or FIBO compared to RIFSW.

Figure 5 Relative expression by quantitative PCR of selected transcripts in resistant oyster population (*OelAP*, *OeFas-ligand*, *OeSOD* and *OeEc-SOD*) libraries. Expression levels were normalized to *EF1- α* and presented as relative expression to controls (mean \pm SD, n = 3). * indicates significant differences of gene expression compared

to controls. (RIBO: Resistant oysters injected with *Bonamia ostreae*, RFSW: Resistant oysters injected with filter salt sea water)

Figure 6 Relative expression by quantitative PCR of selected transcripts in wild oyster population (OeIAP, OeFas-ligand, OeSOD and OeEc-SOD) libraries. Expression levels were normalized to EF1- α and presented as relative expression to controls (mean \pm SD, n = 3). * indicates significant differences of gene expression compared to controls. (WIBO: Wild oysters injected with *Bonamia ostreae*, WFSW: Wild oysters injected with filter salt sea water)

Figure 7 Cumulative mortality during 6 months of cohabitation in (R) resistant oyster population and (W) wild oyster population.

Figure 8 Percentage of haemocytes positive for non specific esterase activity during the experimental infection by cohabitation. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. W- (Wild haemolymph pool of free of parasite), W+ (wild haemolymph pool infected with the parasite *Bonamia ostreae*), R- (Resistant haemolymph pool of free of parasite), R+ (resistant haemolymph pool infected with the parasite *Bonamia ostreae*).

Figure 9 Percentage of haemocytes positive for ROS during the experimental infection by cohabitation. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. W- (Wild haemolymph pool of free of parasite), W+ (wild haemolymph pool infected with the parasite *Bonamia ostreae*), R- (Resistant haemolymph pool of free of parasite), R+ (resistant haemolymph pool infected with the parasite *Bonamia ostreae*).

Figure 10 Percentage of haemocytes positive for phagocytosis during the experimental infection by cohabitation. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation. W- (Wild haemolymph pool of free of parasite), W+ (wild haemolymph pool infected with the parasite *Bonamia ostreae*), R- (Resistant haemolymph pool of free of parasite), R+ (resistant haemolymph pool infected with the parasite *Bonamia ostreae*). * indicate significant difference for R+ compared to R-

Figure 11 Relative expression by quantitative PCR of selected transcripts in resistant infected oyster population (OelAP, OeFas-ligand, OeSOD and OeEc-SOD) libraries. Expression levels were normalized to EF1- α and presented as relative expression to controls (pool free of parasite) (mean \pm SD, n = 2). * indicates significant differences of gene expression compared to controls.

Figure 12 Relative expression by quantitative PCR of selected transcripts in wild infected oyster population (OelAP, OeFas-ligand, OeSOD and OeEc-SOD) libraries. Expression levels were normalized to EF1- α and presented as relative expression to controls (pool free of parasite) (mean \pm SD, n = 2). * indicates significant differences of gene expression compared to controls.

Fig. 1

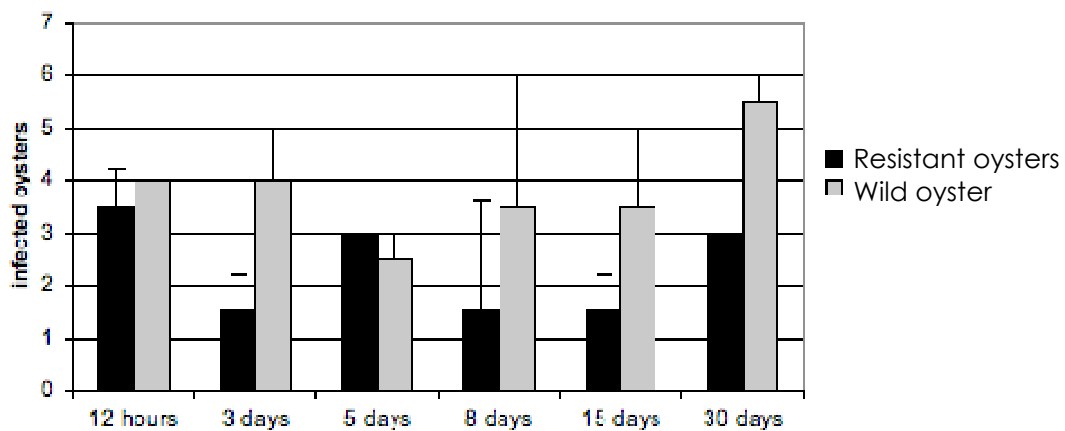


Fig. 2

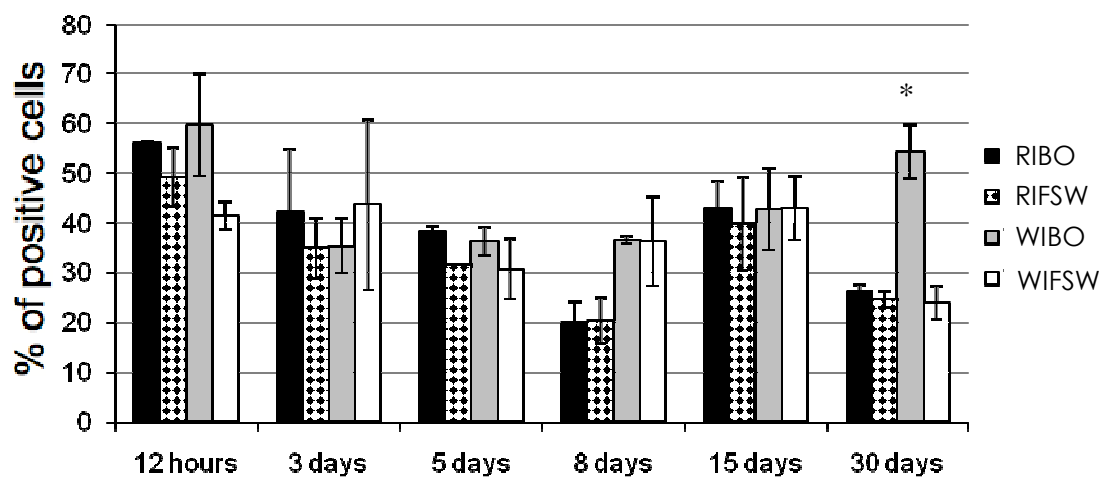


Fig. 3

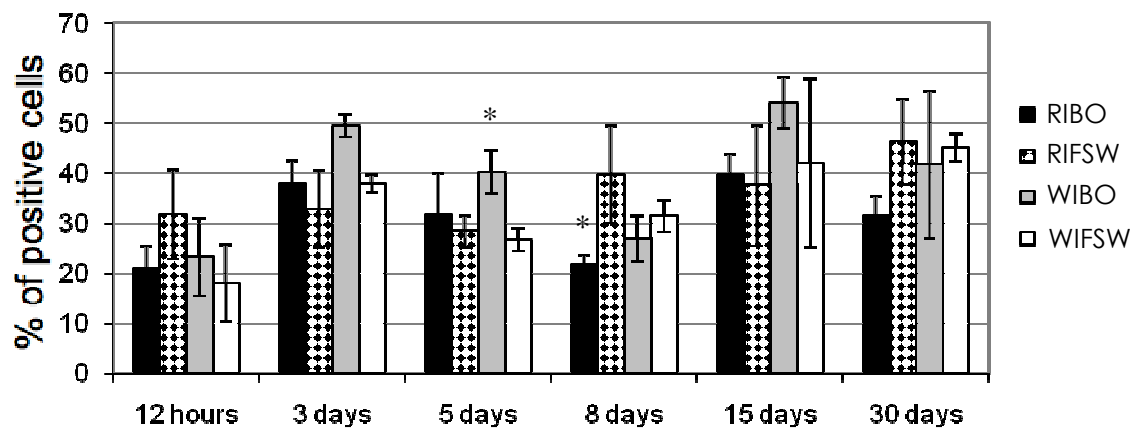
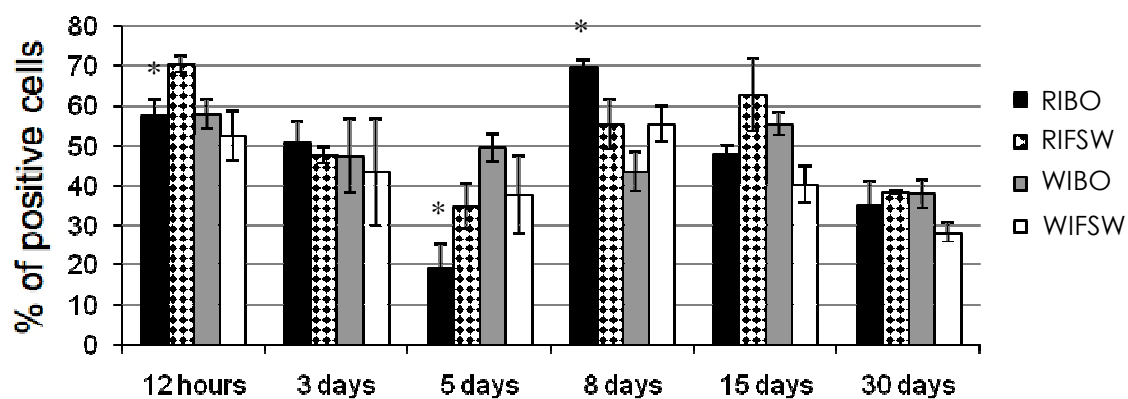


Fig. 4



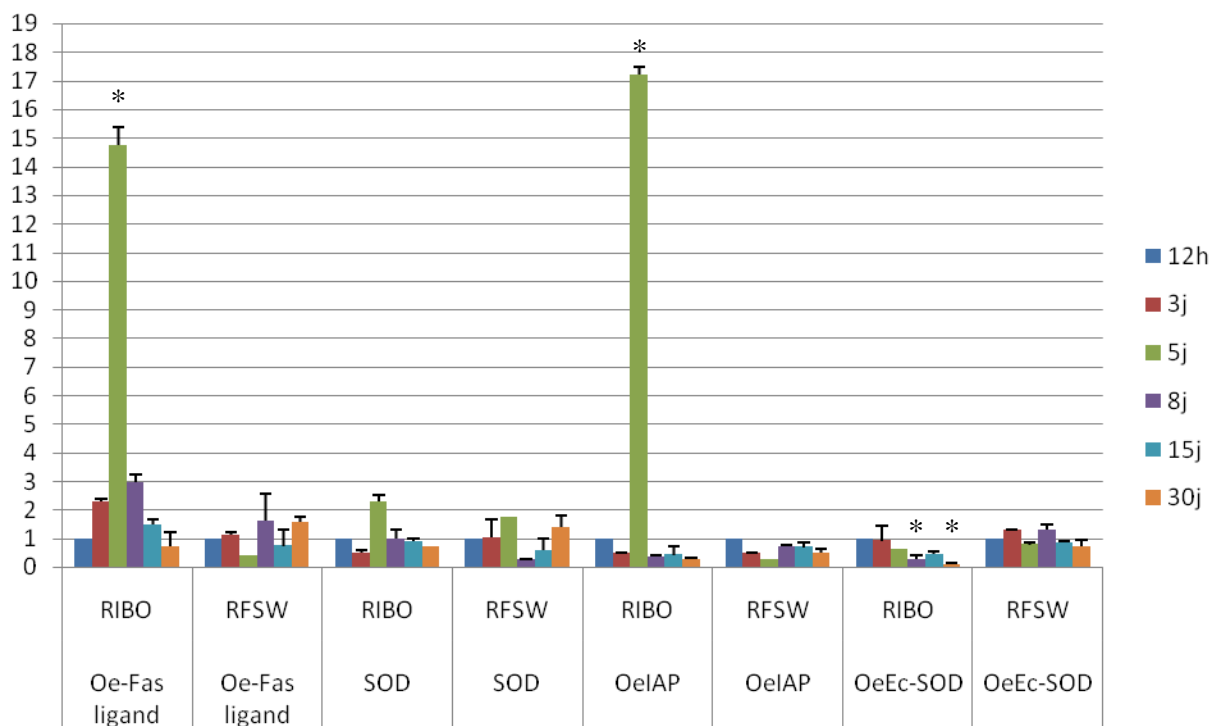


Fig. 5

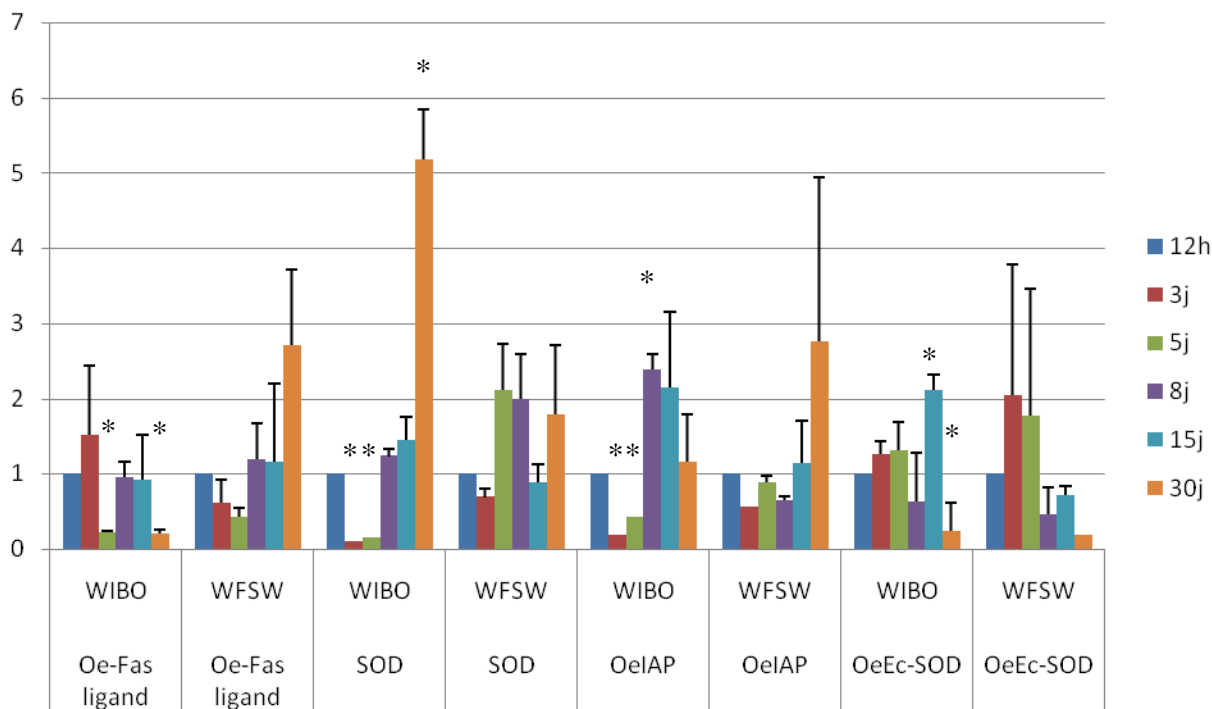


Fig. 6

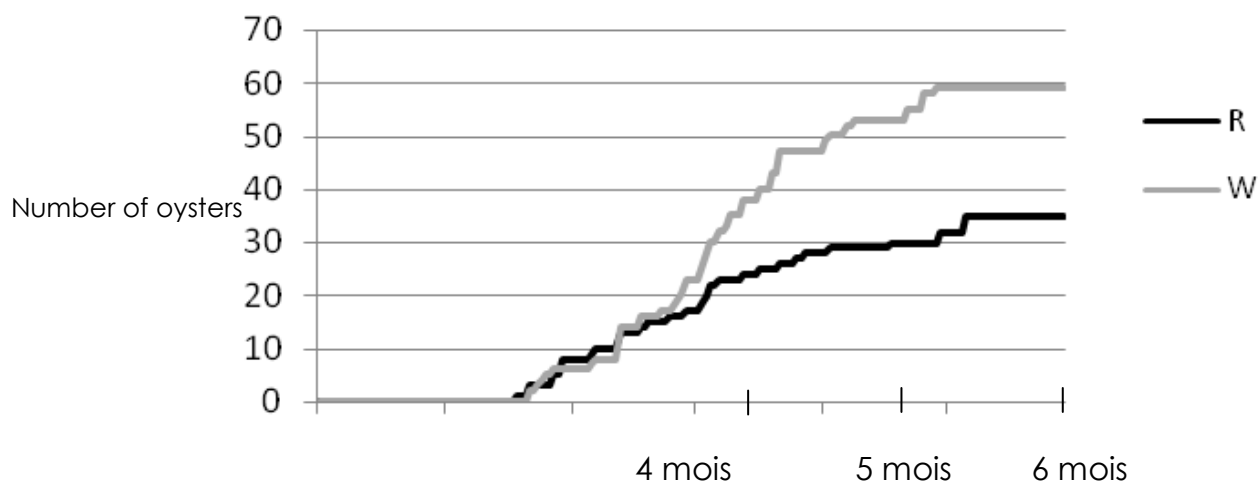


Fig. 7

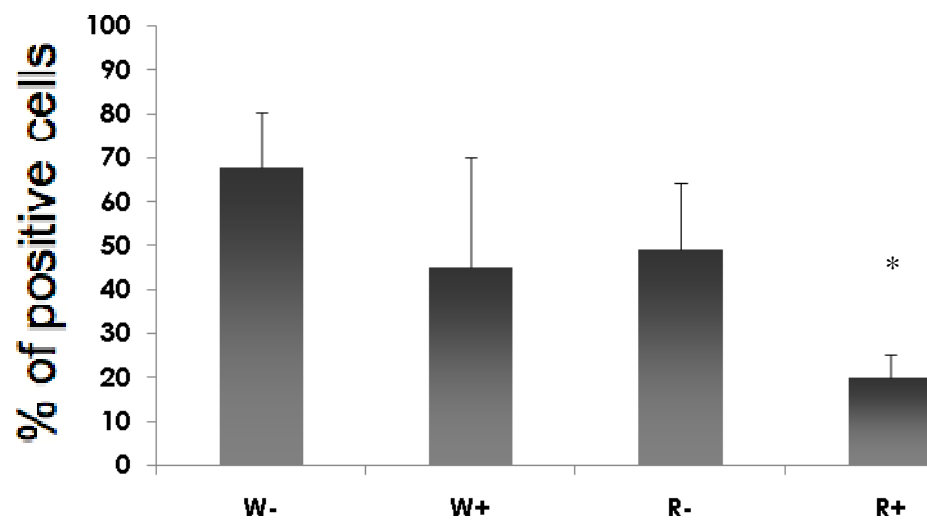


Fig. 8

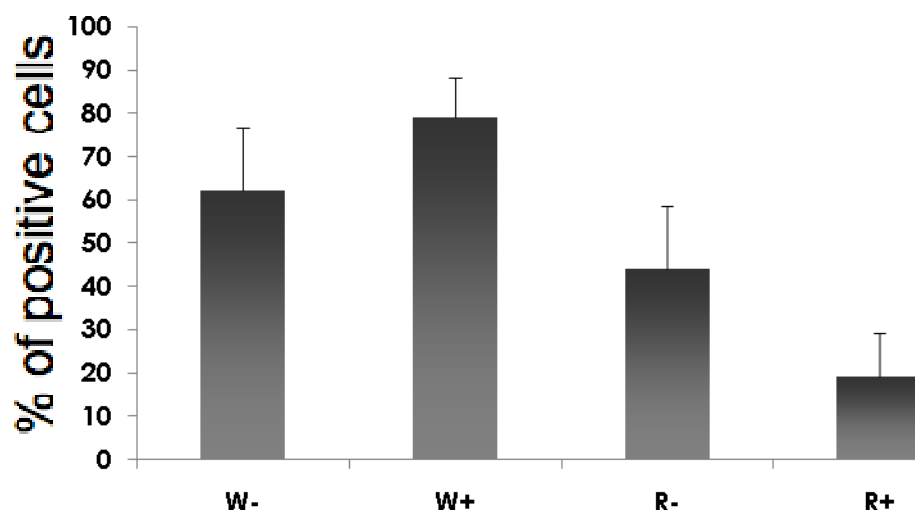


Fig. 9

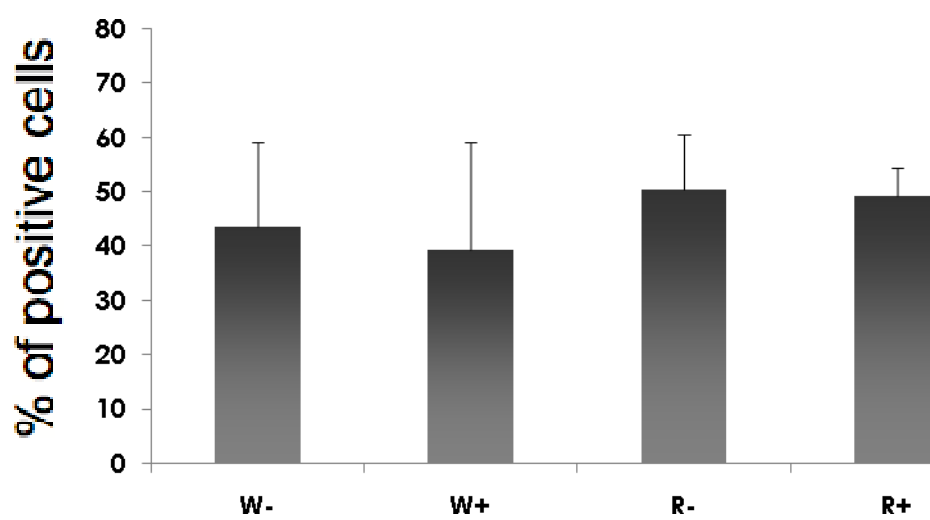


Fig.10

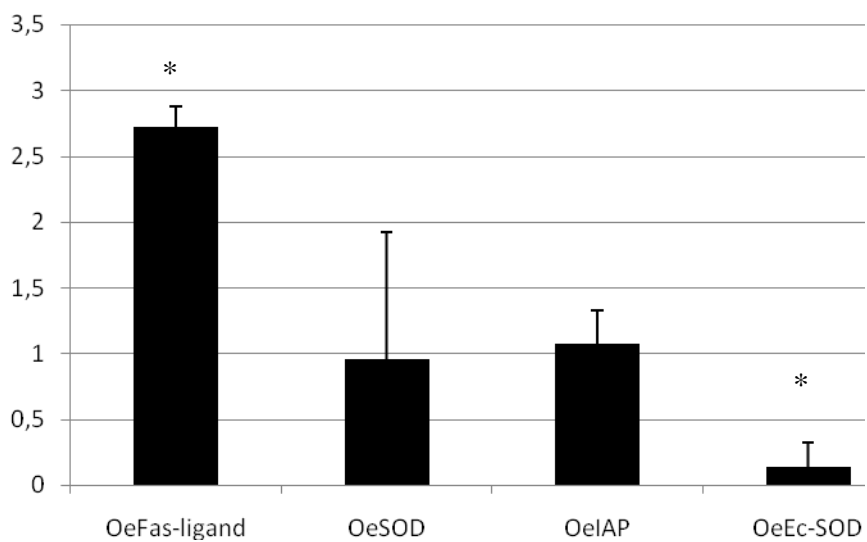


Fig.11

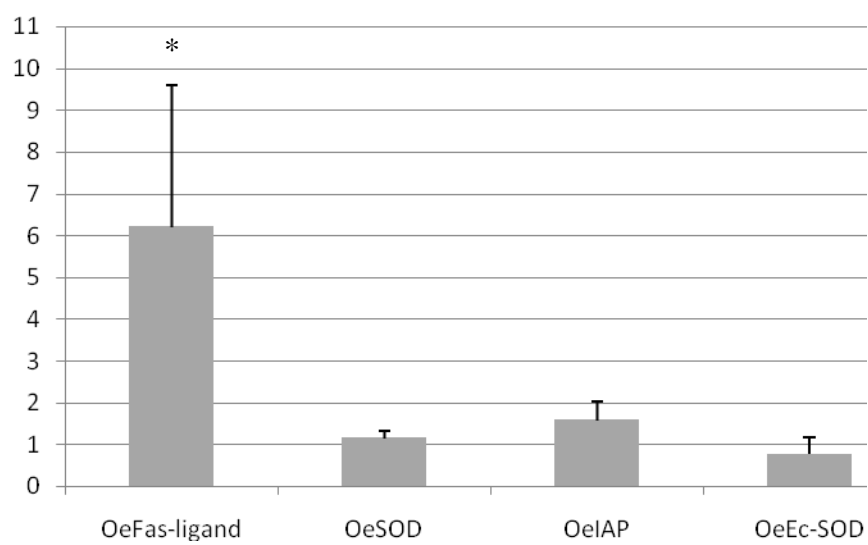


Fig.12

| Name | Oligonucleotide sequence (5'-3') | Concentration of Forward primer (μM) | Concentration of Reverse primer (μM) |
|-------------|----------------------------------|---|---|
| OeIAP | Forward:CTACCTCCCCAGGATTGTCA | 3 | 3 |
| OeFas | Reverse: CACCACTCTCCTCCATGTCA | 1.5 | 3 |
| | Forward:TTGGGCAGTGGTGTAAAGT | | |
| OeSOD | Reverse:TAGCCCTGTTCTCCACCAG | 3 | 3 |
| | Forward: TCGTCAATGTCAGCGTGAA | | |
| OeEc-SOD | Reverse: AAATGTTGGGGCTGGTGA | 2.5 | 2.5 |
| | Forward:GAGGAGGAAGAGGACCATCC | | |
| ElongPCRQ5m | Reverse: ATTTTCCTCCGCTTTGTGTG | 3 | 3 |
| | Forward: GTCGCTCACAGAAGCTGTACC | | |
| | Reverse: CCAGGGTGGTTC AAGATGAT | | |

Table 1: Combinations of primers used in quantitative PCR assays

| | | 4 months | | 5 months | | 6 months | |
|---|---------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| | | Infected | Mortality | Infected | Mortality | Infected | Mortality |
| R | Batch 1 | 7/25 | 11 (2/6) | 2/25 | 2 (0/2) | 1/37 | 0 |
| | Batch 2 | 6/25 | 14 (1/6) | 2/25 | 3 (1/3) | 6/23 | 5 (1/1) |
| W | Batch 1 | 2/25 | 24 (7/18) | 4/25 | 8 (1/2) | 5/17 | 0 |
| | Batch 2 | 6/25 | 15 (5/8) | 8/25 | 9 (2/4) | 2/17 | 0 |

Table 2 Global information concerning the infection during the experimental infection by cohabitation. (R) resistant oyster population, (W) wild oyster population.

IV Résultats complémentaires

IV.1 Analyse des activités enzymatiques dans l'hémolymphe, le plasma et des hémocytes totaux par galerie API ZYM (Api System, Bio-Merieux) chez deux populations d'huîtres plates *Ostrea edulis* et chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

La recherche d'activités enzymatiques a été réalisée à l'aide du système API ZYM (Api System, Bio-Merieux) qui consiste en une galerie de 20 micro-cuves comportant une trame fibreuse inerte sur laquelle sont répartis différents substrats. Ces micro-cuves permettent une détection qualitative et semi quantitative de 19 activités enzymatiques à partir de très faibles quantités d'échantillon. Les hémolymphe ont été poolées pour dix individus par type d'huître.

La phagocytose est l'une des activités hémocytaires essentielles relatives aux fonctions de défense chez les huîtres (Fisher, 1986). Les enzymes hydrolytiques participent à ce processus à l'intérieur et à l'extérieur des hémocytes (Cheng, 1983). À l'intérieur des hémocytes, la dégradation enzymatique est l'un des deux processus de base impliqués dans la destruction des particules étrangères après la phagocytose. Dans la fraction extracellulaire, ces enzymes peuvent modifier la conformation moléculaire de surface des micro-organismes pathogènes et favorisent donc les cellules phagocytaires de la reconnaissance des agents pathogènes (Cheng, 1981, 1983), mais également intervenir dans la destruction de des agents infectieux. Certaines enzymes (le lysozyme, des phosphatases acides, estérases et la β -glucuronidase, lipases, sérines protéases, phénoloxydases) ont été identifiées et utilisées comme critère indiquant les fonctions hémocytaires chez différentes espèces de bivalves.

Dans cette étude, il a été étudié 19 enzymes dans l'hémolymphe, le plasma et les hémocytes chez deux groupes d'huîtres plates (sensibles et résistantes) ainsi que chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Précédemment il a été montré que les

hémocytes d'huître plate (sensibles ou résistantes) et d'huître creuse internalisés le parasite (Chagot, 1989). Cependant, l'huître creuse est capable d'éliminer le parasite, car cette espèce n'est pas sensible à la bonamiose. Ces précédentes études laissent suspecter des différences dans les mécanismes de défense chez les deux espèces.

Le processus de résistance aux infections peut entraîner une réaction de certaines enzymes. Par conséquent il apparaît intéressant de comparer l'état général du métabolisme enzymatique chez une espèce non sensible à la bonamiose, chez un groupe d'huîtres plates résistantes et chez des huîtres plates sensibles.

La recherche d'activités enzymatiques par galerie API ZYM a permis de détecter 14 activités dans l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*. Il a été détecté 13 et 12 activités enzymatiques respectivement dans les hémocytes et le plasma de *Crassostrea gigas* (**Figure 42**). Chez les deux populations d'huîtres plates, il a été détecté 13 activités dans le plasma, l'hémolymphe et les hémocytes (**Figures 42, 43 et 44**). Les travaux réalisés par Da Silva *et al.*, (2007) ont mis en évidence 14 activités enzymatiques chez les hémocytes et le plasma d'*Ostrea edulis* et les hémocytes de l'huître creuse *C. gigas*. Xue and Renault, (2001) avaient identifié 15 et 16 enzymes, respectivement dans l'hémolymphe d'*Ostrea edulis* et *C. gigas*. Ces auteurs ont rapporté une activité enzymatique plus importante chez *C. gigas* par rapport à des huîtres plates saines et infectées par le parasite *Bonamia ostreae*. Ces mêmes auteurs ont émis l'hypothèse que cette différence de concentration pourrait être liée à la résistance naturelle de l'huître creuse au parasite *B. ostreae*.

Concernant les résultats obtenus dans cette étude, il a été observé des concentrations enzymatiques de β -glucuronidase (15) et N-acetyl- β -glucosaminidase (18) significativement ($p < 0,01$ test t) plus importantes dans l'hémolymphe des huîtres plates résistantes. Le niveau plus élevé de ces enzymes laisse suspecter une potentielle implication de ces enzymes dans les mécanismes de résistance. La β -glucosidase (17) a été détectée uniquement dans l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*. Les activités enzymatiques mesurées dans le plasma n'ont pas permis d'observer de différences chez les différentes huîtres testées.

Les résultats obtenus sur les hémocytes doivent être complétés car il a été effectué une seule mesure. Cependant des tendances peuvent être émises. Il a été observé une activité enzymatique globale plus importante chez les hémocytes d'huître plate résistante, avec une quantité potentiellement plus importante pour les enzymes ; phosphatase alcaline (2), naphthol phosphohydrolase (12), β -galactosidase (14), α -glucosidase (15) et N-acétyl- β -glucosaminidase (18). En revanche chez les hémocytes de l'huître creuse, il a été détecté trois enzymes (α -glucosidase (15), N-acétyl- β -glucosaminidase (18) et α -fucosidase (20)) présentant une activité plus élevée que chez les hémocytes d'huîtres sensibles. Chez les hémocytes d'huîtres sensibles, aucune activité n'a été détectée en quantités supérieures par rapport aux autres conditions testées.

En confrontant les résultats obtenus chez hémocytes d'huître creuse et chez les hémocytes des huîtres plates résistantes deux enzymes (15 et 18) sont présentes en quantité supérieure par rapport à celles détectées chez les hémocyte des huîtres plates sensibles. En revanche, l'enzyme 20 est présente en quantité supérieure uniquement chez les hémocytes de l'huître creuse. Ce résultat laisse suspecter une probable implication de ces enzymes dans la résistance/tolérance au parasite *Bonamia ostreae*.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré des différences entre les huîtres plates sélectionnées et les huîtres plates sensibles. Cependant, l'étude doit être complétée par la réalisation de nouvelles expériences notamment sur les hémocytes afin de confirmer les résultats obtenus. De plus, il serait intéressant de quantifier ces enzymes après une infection *in vitro* entre les hémocytes d'huîtres testées et du parasite purifié.

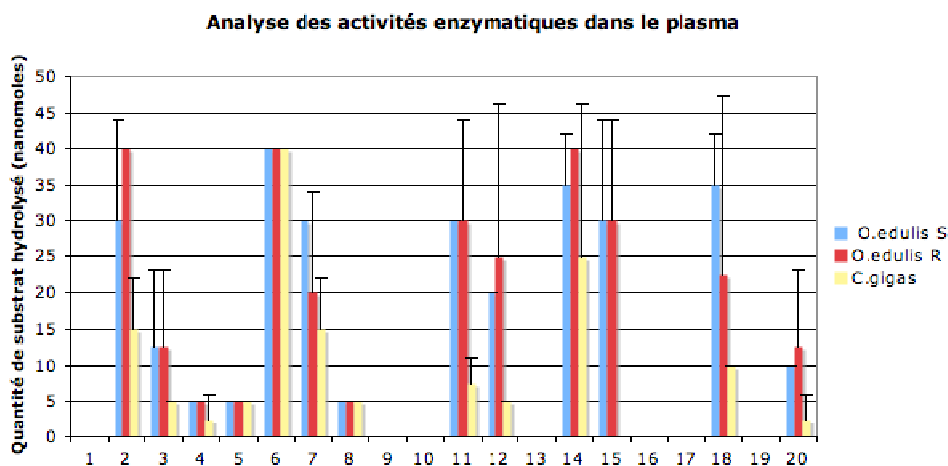


Figure 42 : Analyse des activités enzymatiques dans le plasma

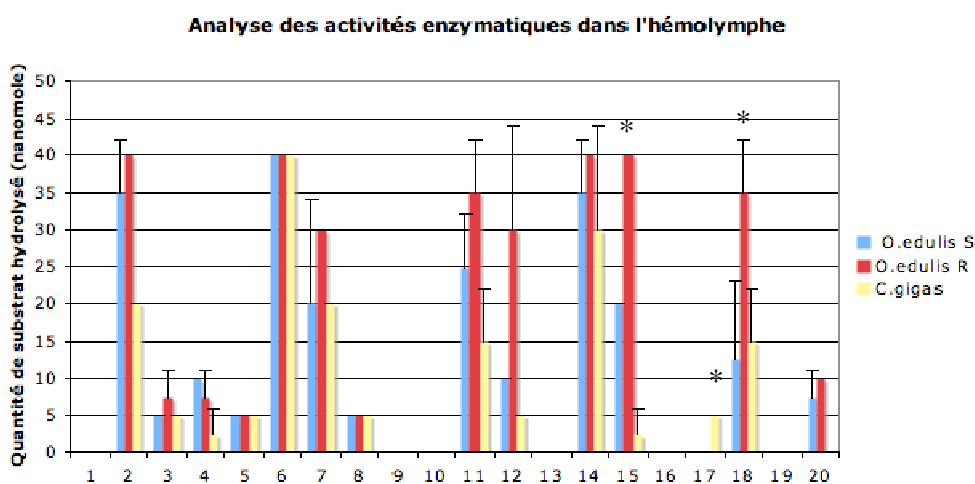


Figure 43 : Analyse des activités enzymatiques dans l'hémolymphe. *indique les différences significatives.

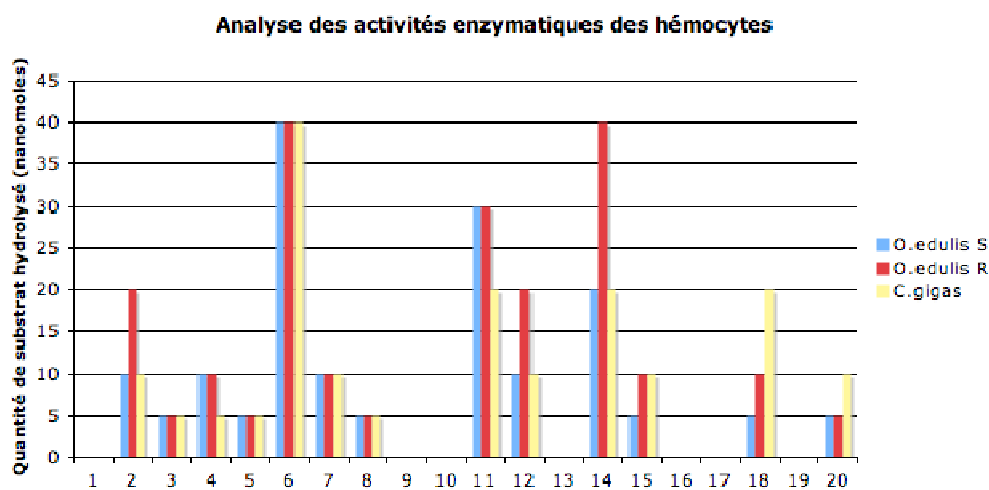


Figure 44 : Analyse des activités enzymatiques dans les hémocytes

V Conclusion

Cette partie a été consacrée à la réalisation d'infections expérimentales *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus ont permis d'obtenir de nouvelles informations sur les interactions entre les hémocytes d'huîtres plates et le parasite *Bonamia ostreae*. La caractérisation de ces interactions au niveau moléculaire et cellulaire a montré l'intérêt d'utiliser plusieurs méthodes d'analyse telles que cytométrie en flux, PCR en temps réel et microscopie photonique.

Le suivi dans le temps d'infections *in vitro* a permis de mettre en évidence une multiplication du parasite à l'intérieur des hémocytes. Cette multiplication parasitaire est associée à une diminution des activités hémocytaires mesurées (estérases, production EOR et phagocytose). Ainsi, *Bonamia ostreae* semble capable de contrer les mécanismes de défense de l'hôte afin de s'installer dans la cellule hôte et de s'y multiplier. De plus, les analyses en PCR en temps réel ont permis d'observer une augmentation du niveau des transcrits chez les hémocytes infectés de la galectine (OeGal), du cytochrome P450, du lysozyme, de la superoxyde dismutase Oe-SOD Cu/Zn et de l'oméga glutathione S transférase (OGST).

Les infections expérimentales *in vivo* ont permis de montrer des différences entre les deux groupes d'huîtres plates testés. En effet, les huîtres plates résistantes présentent des niveaux d'infection et un taux de mortalité plus faibles par rapport aux huîtres plates sensibles. De plus, les hémocytes d'huîtres plates résistantes infectés présentent une capacité de phagocytose plus faible que les hémocytes sains. Le parasite semblerait moduler l'apoptose chez les hémocytes des deux populations. Les hémocytes d'huîtres plates résistantes injectées avec le parasite présenteraient des niveaux d'expression plus élevées du gène OeFas-ligand par rapport aux huîtres plates résistantes injectées avec de l'eau de mer.

Les réponses cellulaires et moléculaires des hémocytes ont été plus marquées au cours des infections *in vitro* qu'au cours des infections expérimentales *in vivo*. Ces différences sont dues aux modes d'infections. En effet, l'étude des interactions au cours d'infections *in vitro* permet d'obtenir une réponse directe et plus « aigüe » car le parasite est immédiatement en contact avec les hémocytes. En revanche, les

infections expérimentales par injection et cohabitation ne permettent pas d'avoir une réponse directe. D'autres barrières existent au sein de l'huître et peuvent contribuer à éliminer le parasite avant que celui-ci n'atteigne les hémocytes. Les réponses obtenues sont ainsi plus nuancées. (Figure 45).

La réalisation de ces travaux ouvre de nouvelles perspectives d'étude sur les mécanismes impliqués dans la résistance à la bonamiose.

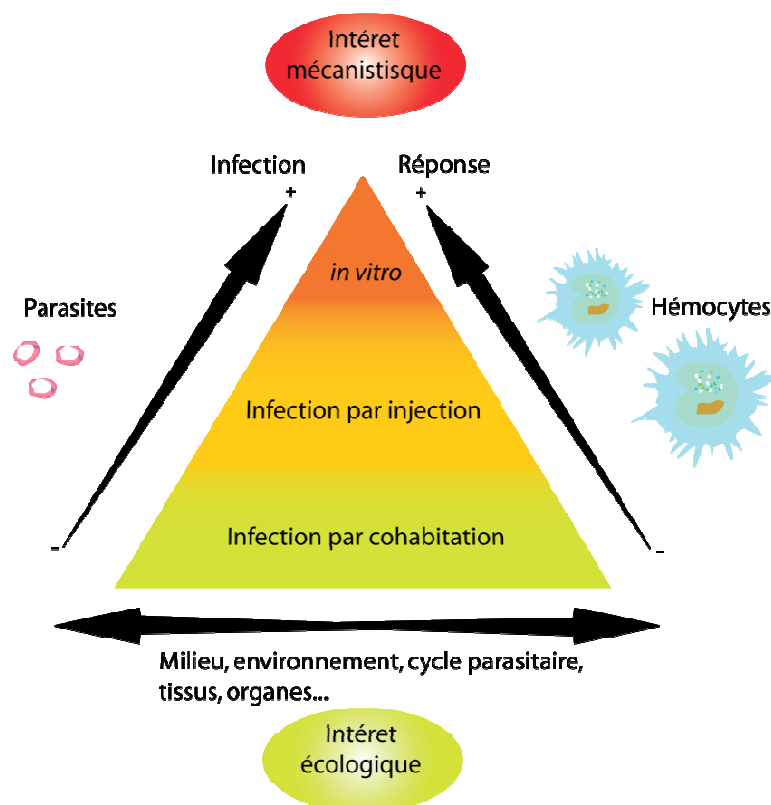


Figure 45 : Synthèse des différentes études pour la caractérisation des interactions entre hémocytes d'huîtres plates et son parasite *Bonamia ostreae*

Conclusion générale et perspectives

La détection du parasite *Bonamia ostreae* associée à de fortes mortalités en 1979 sur l'île Tudy (Finistère, France) a eu un fort impact sur la production d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, sur les côtes européennes. La bonamiose, nom donnée à la maladie associée au parasite protozoaire *B. ostreae*, est listée comme maladie à déclaration obligatoire par l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE) et par l'Union Européenne (UE) en raison de l'impact économique qu'elle peut engendrer sur la filière ostréicole française et européenne.

Les moyens de lutte contre le parasite sont restreints du fait de l'impossibilité d'utiliser des traitements chimiques. L'absence de mémoire immunitaire (au sens conventionnel du terme) chez les invertébrés ne permet pas d'utiliser la vaccination comme moyen prophylactique contre le développement de cette maladie. Ainsi, les principaux moyens de lutte contre ce parasite reposent sur une réglementation des transferts d'animaux et de leurs produits au travers de textes législatifs, mais également sur l'amélioration génétique par la sélection.

Le développement d'huîtres plates résistantes au parasite reste en effet l'une des pistes majeures à explorer afin de maintenir cette espèce sur les côtes françaises et européennes. Les huîtres plates persistent et continuent de se reproduire dans les zones infectées ce qui laisse suspecter une résistance naturelle à la bonamiose chez cette espèce. L'Ifremer a débuté en 1985 un projet visant à produire des familles d'huîtres plates sélectionnées sur la base de leur résistance. Ce programme de sélection a permis d'obtenir des animaux présentant des taux de mortalité réduits chez les animaux de taille commerciale élevés dans des zones où la maladie est endémique. Cependant, cette sélection n'a porté que sur le caractère de survie des huîtres suite à l'infection.

La caractérisation des mécanismes de la réponse de l'huître au parasite *Bonamia ostreae* devrait permettre de sélectionner des individus résistants grâce à l'utilisation de marqueurs cellulaires et/ou moléculaires. De telles connaissances pourraient ainsi permettre de maintenir l'huître plate voire de relancer la culture de cette espèce sur les côtes françaises et européennes. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse a été réalisé. Les objectifs étaient (1) d'améliorer les connaissances moléculaires sur l'hôte *Ostrea edulis* et plus particulièrement les bases moléculaires impliquées dans

la résistance ou la sensibilité à la bonamiose, et (2) de réaliser des infections *in vitro* et *in vivo* afin d'identifier les processus de régulation de certains gènes ainsi que les réponses cellulaires des hémocytes.

Le modèle d'étude retenu dans ce travail présente un intérêt particulier du fait du double rôle joué par les hémocytes qui sont à la fois les effecteurs de l'immunité de l'huître plate, mais aussi les cellules hôtes du parasite *Bonamia ostreae*. De plus, les précédents travaux réalisés par Mialhe *et al.*, (1988) ont permis d'établir un protocole permettant la purification du parasite à partir d'animaux infectés et de réaliser des infections en conditions contrôlées au laboratoire.

Dans un premier temps, ce travail a permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés suite à la réalisation de banques soustractives d'ADNc à partir d'hémocytes mis au contact ou non du parasite. Un travail de génomique comparative a permis notamment d'identifier sept ESTs potentiellement impliqués dans les interactions hôte/parasite. Ainsi, une lectine de type galectine pourrait être impliquée dans la reconnaissance du parasite. Cette lectine a déjà été identifiée chez *Crassostrea virginica* en réponse au parasite *Perkinsus marinus* (Tasumi & Vasta, 2007). De plus, l'activation de cette lectine est associée à une augmentation des transcrits du gène codant pour la filamine, l'implication de cette molécule dans le cytosquelette laisse suspecter une implication du cytosquelette de l'hôte dans l'internalisation du parasite. Une précédente étude réalisée par Chagot *et al.*, (1989) avait permis de montrer une diminution du nombre de parasites internalisés suite à un traitement des hémocytes par la cytochalasine B. La cytochalasine B possède des propriétés inhibitrices sur le cytosquelette. La participation du cytosquelette de l'hôte dans l'internalisation de parasites intracellulaires a également été démontrée chez *Toxoplasma gondii* (Gonzalez *et al.*, 2009).

La mise en évidence d'une superoxyde dismutase (OeSOD) a quant à elle permis d'observer une légère augmentation des transcrits de ce gène suite à une infection *in vitro*. La SOD est notamment impliquée dans la transformation des radicaux libres O_2^- en H_2O_2 . Les peroxydes ont des propriétés microbicides vis-à-vis des agents infectieux, mais sont également agressifs vis à vis des membranes des cellules hôtes. Ce résultat laisse suspecter une implication de la flambée oxydative dans la réponse des hémocytes à l'infection par le parasite *Bonamia ostreae*. De plus, il a été

identifié un gène impliqué dans la détoxification des radicaux libres, l'oméga glutathione S-transférase (OGST). Ce gène est également apparu surexprimé chez les hémocytes infectés par le parasite peut être en réponse à un excès de radicaux libres produits par la cellule hôte ou par le parasite.

Deux autres gènes, que sont le tissu inhibiteur of metalloprotéase (TIMP) et un régulateur de l'interféron (OeIRF), ont été identifiés comme potentiellement surexprimés en présence de parasites vivants. L'identification du gène OeIRF est assez surprenante car aucun membre de la cascade d'activation de l'interféron n'a été identifié jusqu'à présent chez les mollusques bivalves. En revanche, la surexpression de TIMP peut traduire une réponse de l'hôte aux protéases produites par le parasite.

Des infections *in vitro* ont été réalisées afin de suivre la réponse cellulaire des hémocytes infectés en cytométrie en flux. Les activités hémocytaires mesurées ont montré qu'après deux heures de mise en contact, les parasites vivants comme ceux inactivés à la chaleur sont internalisés par les hémocytes tandis qu'une diminution de la production des EORs et de la détection d'estérases non spécifiques est observée après internalisation des parasites vivants. Les estérases sont notamment impliquées dans la dégradation des particules internalisées. La présence d'enzymes chez *Bonamia ostreae*, capables d'inhiber la production d'enzymes hydrolytiques telles que les estérases, pourrait expliquer la diminution de la détection de ces dernières et traduire un mécanisme par lequel le parasite échappe à la dégradation. De plus, la diminution de la production d'EORs chez les hémocytes infectés par le parasite vivant laisse suspecter une participation active du parasite afin de se protéger contre les EORs produits par les hémocytes. De tels mécanismes ont été rapportés chez d'autres parasites intracellulaires. Des activités de type phosphatases acides décrites chez le parasite pourraient être responsables de cette diminution de la production des EORs. En effet, les phosphatases acides sont connues pour inactiver la production de NADP(H) oxydase.

L'ensemble des données obtenues dans ces deux approches est résumé dans le schéma suivant (**Figure 46**).

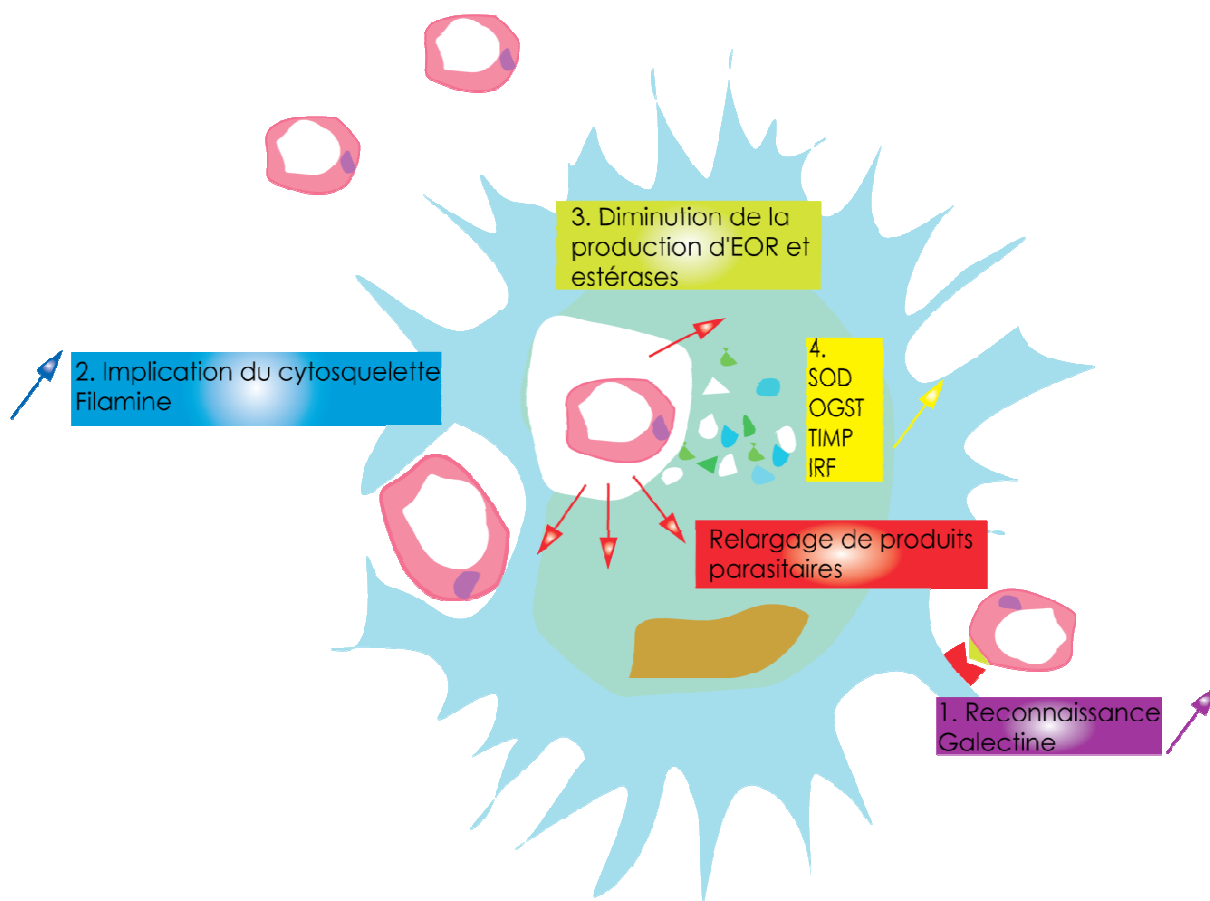


Figure 46 : Schéma récapitulatif des interactions hôte/parasite observées chez des hémocytes d'*Ostrea edulis* après deux heures d'infection *in vitro* par le parasite *Bonamia ostreae*

Afin de compléter les données obtenues à deux heures post-infection, les réponses moléculaires et cellulaires précédemment identifiées ont été suivies au cours d'une d'infection in vitro à différents temps (1h, 2h, 4h et 8h).

L'observation de cellules centrifugées a d'abord permis de suspecter une multiplication du parasite dans les hémocytes d'huître plates. Les analyses par cytométrie en flux ont ensuite permis de montrer la diminution de la production d'EORs et des estérases non spécifiques après 1h, 2h et 4h d'infection. Ces résultats confirment donc la capacité du parasite à inhiber les mécanismes de dégradation mis en jeu par les hémocytes. Une diminution de l'activité phagocytaire a également été observée après deux heures d'infection, ce qui pourrait être dû à la multiplication du parasite à l'intérieur des hémocytes.

L'identification d'une SOD cytoplasmique et d'une SOD extracellulaire a permis d'apporter des éléments complémentaires concernant l'implication de ces molécules dans les interactions entre les hémocytes d'huîtres plates et le parasite *Bonamia ostreae*. Le suivi de l'expression de ces deux gènes a montré une sous-expression de la SOD extracellulaire et une légère surexpression de la SOD cytoplasmique après 2 et 4 heures. Les enzymes de type SOD permettent la dismutation des ions O_2^- en H_2O_2 . Les ions O_2^- sont les premiers EOR produits au cours de la flambée oxydative et sont des radicaux très toxiques que l'organisme doit rapidement éliminer pour éviter la destruction des membranes de ses propres cellules. Les SOD sont impliquées dans la cascade de transformation des ions O_2^- et permettent ainsi de protéger les cellules. Une surexpression des transcrits de gènes codant pour des SOD peut donc être interprétée comme une réponse à une induction de la flambée oxydative, alors qu'une inhibition pourrait induire des effets délétères pour les huîtres elles-mêmes. Le parasite pourrait être capable d'inhiber la production d'EOR, mais également la transcription de gènes codant des SOD. Cependant la sur-expression de la SOD cytoplasmique pourrait correspondre à une réponse normale suite à une augmentation des EOR induites par la pénétration du parasite dans les cellules.

Une augmentation du niveau d'expression des gènes codant pour l'OGST et le cytochrome P450 a également été observée après 1 heure d'infection. Le cytochrome P450 est notamment impliqué dans la dégradation des molécules exogènes. Ces molécules exogènes pourraient correspondre à des molécules

relarguées par la destruction de certains parasites dans le cytoplasme des hémocytes.

Le suivi de l'expression d'OeGal confirme bien la probable implication de cette lectine dans la reconnaissance du parasite qui faciliterait son internalisation. La galectine est effectivement sur exprimée dès le début de l'infection correspondant à la première phase (reconnaissance) dans le processus de phagocytose. De plus, il a été identifié une surexpression du gène codant le lysozyme laissant suspecter une possible implication de ce gène dans les interactions entre hémocytes et *Bonamia ostreae*.

Pris dans sa globalité, ce travail démontre l'utilité de coupler plusieurs méthodes d'analyse afin d'étudier *in vitro* la réponse des hémocytes à une infection à *Bonamia ostreae* et nous permet de proposer le schéma suivant : (**Figure 47**).

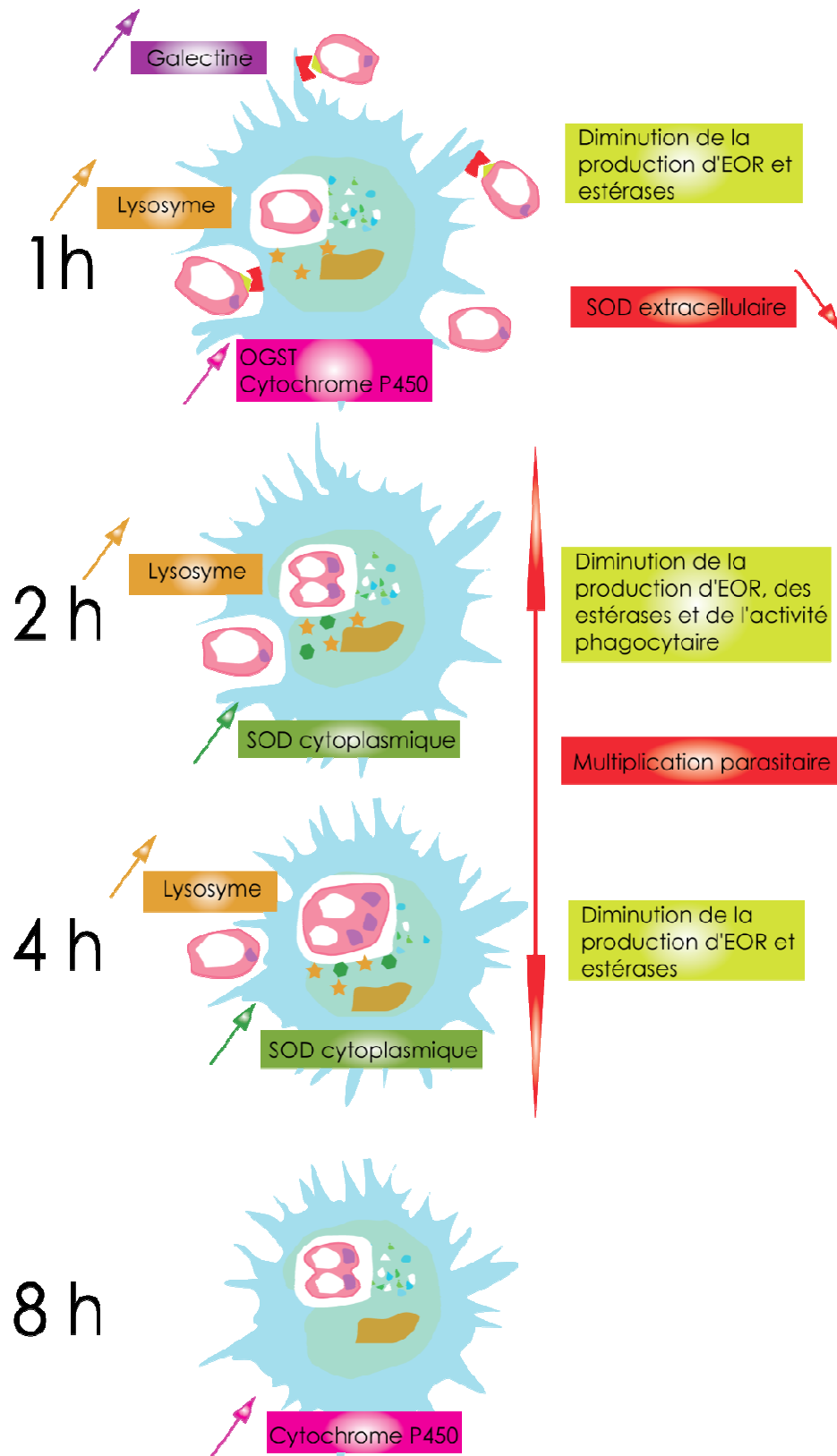


Figure 47 : Schéma récapitulatif de la réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes d'huîtres plates infectés par le parasite après 1h, 2h, 4h et 8h de mise en contact avec *Bonamia ostreae*.

Dans un second temps, les mécanismes cellulaires et moléculaires liés aux phénomènes de résistance et de sensibilité à la maladie ont été étudiés chez deux groupes d'huîtres : des huîtres plates dites « sensibles » provenant du milieu naturel, et des huîtres plates dites « résistantes » provenant d'un programme de sélection et produites en éclosion.

La réalisation de banques d'ADNc a permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés en réponse à l'infection par le parasite *Bonamia ostreae* chez les deux groupes. Il a notamment été identifié des gènes impliqués dans la détoxification (Oe-EcSOD) et dans l'immunité (OeIAP, OeFas-ligand, cathepsine B, cyclophiline B et OeC1q).

L'analyse des niveaux d'expression de ces gènes par PCR en temps réel a montré une surexpression d'Oe-EcSOD chez les hémocytes d'huîtres plates résistantes. Ce résultat suggère un mécanisme exacerbé de dismutation des radicaux libres O_2^- pouvant permettre de limiter les effets négatifs de ces radicaux sur les composants cellulaires et le développement de lésions suite à l'infection par le parasite. Les huîtres résistantes auraient de ce fait un avantage par rapport aux huîtres non sélectionnées en étant capables de limiter les effets néfastes du parasite sur leurs propres cellules et tissus. L'implication de ce gène a d'ailleurs déjà été rapportée chez les huîtres australiennes résistantes au parasite *Marteilia sydneyi*.

De plus, il a été observé une surexpression de trois gènes impliqués dans l'induction et l'inhibition de l'apoptose, l'OeIAP, le OeFas-ligand et de la cathepsine B, chez les hémocytes provenant d'huîtres résistantes infectées par le parasite *Bonamia ostreae*. L'apoptose est un mécanisme complexe permettant d'éviter ou de limiter la dissémination des agents infectieux dans l'organisme. L'induction de l'apoptose a été décrite dans d'autres modèles d'infection par des parasites intracellulaires tels que *Perkinsus marinus*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzii*, *Plasmodium sp.*, et *Cryptosporidium parvum*. Le déclenchement de la mort cellulaire programmée pourrait constituer l'un des mécanismes impliqués dans la résistance à la bonamiose. L'identification du gène OeFas-ligand laisse suspecter une activation de la cascade de l'apoptose chez certaines cellules afin d'empêcher et/ou de limiter la prolifération du parasite dans les cellules cibles. Cependant, l'apoptose n'est pas sans conséquences négatives pour l'organisme hôte et nécessite donc la mise en place de phénomènes de régulation visant à limiter et contrôler le phénomène.

Ainsi, l'observation de la sur expression du gène codant pour l'OelAP chez les hémocytes issus d'huîtres résistantes laisse suspecter une régulation de l'apoptose par l'huître elle-même. En effet, les IAP ont des propriétés anti-apoptotiques. Une augmentation des transcrits du gène codant pour l'OelAP pourrait induire une régulation négative de l'apoptose en bloquant la cascade d'activation de l'apoptose.

Par ailleurs, il est également possible que le parasite lui-même manipule le phénomène apoptotique chez son hôte et favorise ainsi sa propre installation dans les cellules hôtes en inhibant le mort cellulaire programmée dans les hémocytes qu'il infecte. L'induction du gène codant pour l'OelAP chez les hémocytes infectées conduirait à une survie du parasite dans les cellules.

La présence de plusieurs types cellulaires dans l'hémolymphe de l'huître plate pourrait aussi expliquer une diversité de réponse en termes d'apoptose. Certains types cellulaires pourraient être capables d'entrer en apoptose du fait de la présence de récepteurs Fas à leur surface alors que d'autres non. Bien que *Bonamia ostreae* soit capable d'infecter tous les types cellulaires présents dans l'hémolymphe, plusieurs auteurs ont rapporté que les hyalinocytes semblaient être les cellules cibles privilégiées du parasite.

Les infections expérimentales par injection et par cohabitation réalisées dans les installations d'élevage du Laboratoire de Génétique et Pathologie (Ifremer, La Tremblade, Charente Maritime) ont induit des mortalités plus élevées chez les huîtres plates sensibles que chez les huîtres résistantes. D'une manière générale, les huîtres résistantes infectées par injection comme par cohabitation présentaient une activité phagocytaire moindre que les huîtres sensibles. Pour les autres activités hémocytaires, des résultats divergents ont été observés en fonction du mode d'infection expérimentale utilisée. L'infection par injection permet de maîtriser la quantité de parasites injectés tandis que l'infection par cohabitation ne le permet pas. Cette dernière reflète d'avantage les conditions naturelles mais, de ce fait, est plus lente, moins intense et plus complexe à comprendre.

De façon générale, les réponses observées dans le cadre des infections *in vitro* apparaissent plus contrastées que dans le cadre des infections *in vivo* mais elles ne reflètent pas la complexité des interactions qui peuvent exister chez les animaux.

Elles nous ont néanmoins permis d'identifier des mécanismes impliqués dans la résistance et la sensibilité des huîtres à l'infection et les résultats obtenus ont pu être confirmés ou nuancés par ceux obtenus lors des infections *in vivo*.

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse apportent de nouvelles informations concernant les bases moléculaires et cellulaires impliquées dans la résistance à la bonamiose (**Figure 48**).

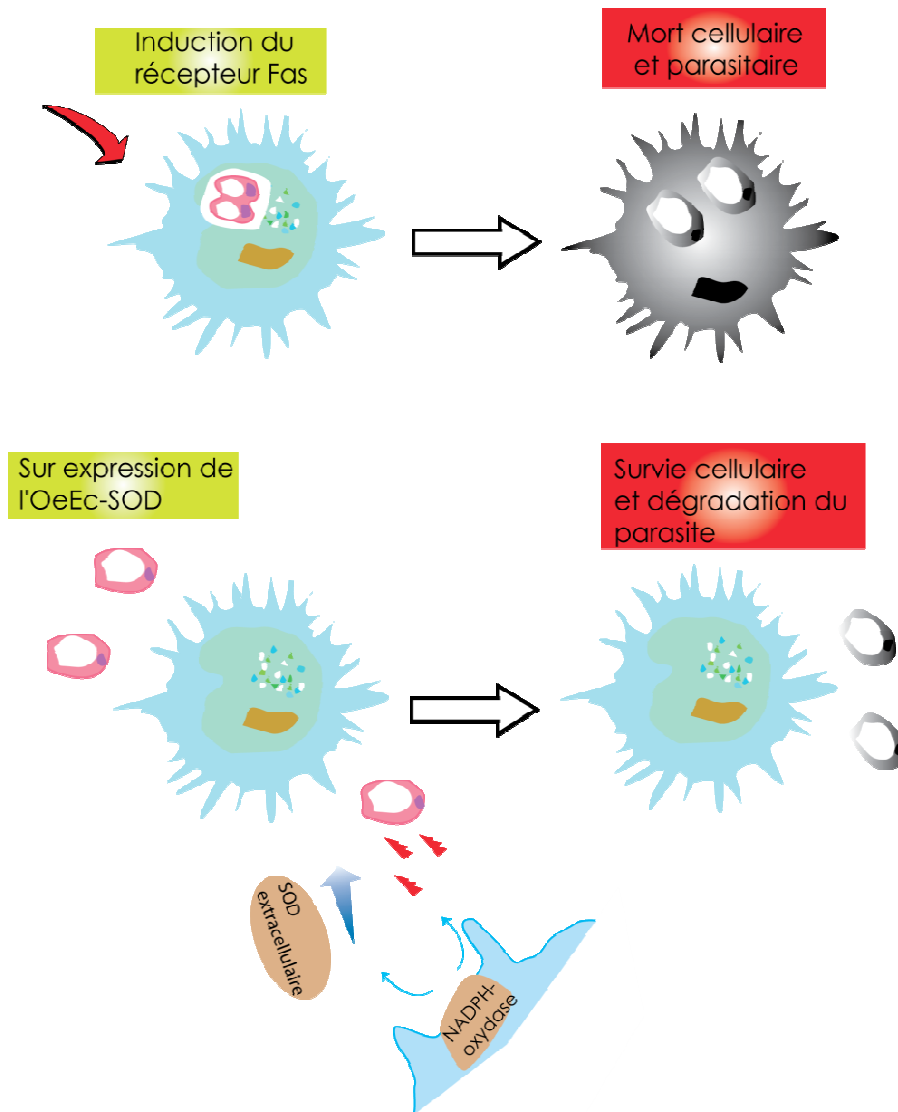


Figure 48 : Schéma de synthèse des mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance à la bonamiose (*in vitro*)

En conclusion, ces travaux de thèse ont consisté à mettre en place des outils de génomique comparative spécifique chez l'huître plate *Ostrea edulis*. La construction de différentes banques d'ADNc a pour la première fois mené à l'identification et à la caractérisation de certains gènes impliqués dans les interactions hôte/parasite chez l'huître plate. L'analyse du niveau d'expression de ces gènes a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur le modèle.

Parmi l'ensemble des résultats obtenus, l'identification de la galectine chez *Ostrea edulis* ouvre de nouvelles perspectives d'études afin de clarifier plus précisément les implications de cette protéine au cours de l'infection. De plus, l'identification de la sur expression d'un gène impliqué dans le cytosquelette (la filamine) laisse suspecter une probable participation du cytosquelette de l'hôte dans l'internalisation du parasite. L'implication du cytosquelette de l'hôte dans l'internalisation d'un parasite intracellulaire est couramment décrite dans la littérature. Des études complémentaires sur le cytosquelette de l'hôte au cours d'infections *in vitro* permettraient de répondre à cette probable hypothèse.

L'implication manifeste de certains gènes de la cascade d'activation de l'apoptose dans la résistance des huîtres vis à vis du parasite nécessite la réalisation d'études complémentaires sur ce mécanisme déjà décrit chez d'autres bivalves. Cependant, l'activation de la superoxyde dismutase extracellulaire chez les hémocytes résistants laisse suspecter une implication de ce gène dans la résistance. Une étude complémentaire sur la fonction et l'implication de ce gène apporterait des informations supplémentaires sur le rôle du métabolisme oxydatif contre la bonamiose.

L'ensemble des données moléculaires acquises au cours de ce travail chez *Ostrea edulis* permet actuellement de développer des marqueurs moléculaires de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ainsi que des microsatellites. L'identification de ces marqueurs moléculaires pourra également contribuer à l'identification des relations entre génotype et phénotype par le biais d'approches par QTL (Quantitative Trait Locus). Le trait phénotypique considéré serait alors la mortalité des huîtres plates liée à la bonamiose. L'utilisation de familles d'huîtres plates présentant des mortalités

contrastées permettrait de réaliser une carte génétique de l'huître plate avec l'identification de QTL associés à la résistance ou la sensibilité à la bonamiose.

Enfin, le séquençage complet du génome du parasite *Bonamia ostreae* ouvrirait de nouvelles perspectives d'études sur les gènes parasitaires impliqués dans les interactions entre hémocytes et parasites.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Adema, C.M., Hertel, L.A., Miller, R.D. and Loker, E.S. (1997) A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16), 8691-6.
- Adlard, R.D. and Ernst, I. (1995) Extended range of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi*. *Bull. Eur. Assn. Fish*(15), 119-121.
- Akira, S., Yamamoto, M. and Takeda, K. (2003) Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 3), 637-42.
- Aladaileh, S., Nair, S.V., Birch, D. and Raftos, D.A. (2007) Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *J Invertebr Pathol* 96(1), 48-63.
- Alavi, M.R., Fernandez-Robledo, J.A. and Vasta, G.R. (2009) In Vitro Intracellular Survival of *Perkinsus Marinus* Trophozoites Upon Phagocytosis by Oyster (*Crassostrea Virginica* and *Crassostrea Ariakensis*) Hemocytes. *J Parasitol*, 1.
- Alexander, J. and Russell, D.G. (1992) The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol* 31, 175-254.
- Alvarez M.R., Friedl F.E., Johnson J.S. and G.W., H. (1989) Factors affecting in vitro phagocytosis by oyster hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 54, 233-241.
- Amanullah, A., Azam, N., Balliet, A., Hollander, C., Hoffman, B., Fornace, A. and Liebermann, D. (2003) Cell signalling: cell survival and a Gadd45-factor deficiency. *Nature* 424(6950), 741; discussion 742.
- Anderson, R.S., Burrenson, E.M. and Paynter, K.T. (1995) Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 66, 82-89.
- Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L. and Griffiths, G. (1990) A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61(7), 1277-87.
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G. and Berthe, F.C. (2008) Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. *J Invertebr Pathol* 99(3), 326-31.
- Arzul, I., Gagnaire, B., Bond, C., Chollet, B., Morga, B., Ferrand, S., Robert, M. and Renault, T. (2009) Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organism* 85, 67-75.
- Asokan, R., Arumugam, M. and Mullainadhan, P. (1997) Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev Comp Immunol* 21(1), 1-12.
- Auffret, M. (1985) Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. . Thèse de 3ème cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest., 153 p.
- Auffret, M. (1989) Comparative study of the hemocytes of two oyster species: The European flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Shellfish Research* 8, 367-373.
- Auffret, M. and Oubella, R. (1994) Cytometric parameters of bivalve molluscs : effect of environmental factors. . In: Stolen, J.S. & Fletcher, T.C. (eds) *Modulators of fish immune responses. Models for environmental toxicology, biomarkers, immunostimulators*. SOS Publication, Fair Haven, NJ, USA 1, 23-32.
- Auffret, M. and Oubella, R. (1997) Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A* 118, 705-712.
- Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. and Romestand, B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 198, 149-68.
- Bachère, E., Hervio, D. and Mialhe, E. (1991) Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 11, 173-180.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noël, D., Boulo, V., Morvan, A. and Rodriguez, J. (1995) Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132(17-32).
- Balouet, G., Poder, M. and Cahour, A. (1983) Haemocytic parasitosis : morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 34, 1-14.
- Barber, B.J. and Davis, C.V. (1994) Prevalence of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* populations in Maine. *Journal of Shellfish Research* 13(1), 298.
- Baud, J.P., Gerard, A. and NaciriGraven, Y. (1997) Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. *Marine Biology* 130(1), 71-79.
- Beckmann, N., Morse, M.P. and Moore, C.M. (1992) Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 124-132.

- Bédier, E., Cochennec-laureau, N., Langlade, A., Kopp, J., Goyard, E. and A., G. (2001) Recovery of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.): new development. EAS, August 4-7, 2001, Trondheim, Norway.
- Bender, R.C. and Bayne, C.J. (1996) Purification and characterization of a tetrameric alpha- macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. *Biochem J.* 316(Pt 3), 893-900.
- Berthe, F.C.J., Le Roux, F., Adlard, R.D. and Figueras, A. (2004) Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquatic living resources/Ressources vivantes aquatiques [Aquat. Living Resour./Ressour. Vivantes Aquat.]*. Vol. 17, no. 4.
- Bertho, A.L., Santiago, M.A., Da-Cruz, A.M. and Coutinho, S.G. (2000) Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 33(3), 317-25.
- Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40(12), 845-59.
- Bezemer, B., Butt, D., Nell, J., Adlard, R. and Raftos, D. (2006) Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish Shellfish Immunol* 20(4), 627-36.
- Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitsh, K.A. and Olivier, M. (1999) Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol* 29(11), 3737-44.
- Bodoy, A., Bougrier, S., Geairon, P., Garnier, J., Boulo, V. and Heurtebise, S. (1991) Does the prevalence of Bonamia and Marteilia diseases be reduced (sic) on flat oysters (*Ostrea edulis*) of Atlantic and Mediterranean origin, when they are reared together with the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in tidal ponds? Ices, Copenhagen (Denmark).
- Bohlsón, S.S., Fraser, D.A. and Tenner, A.J. (2007) Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol* 44(1-3), 33-43.
- Bording, S. and Tan, X. (2001) C1q arrest the cell cycle progression of fibroblasts in G(1) phase: role of the cAMP/PKA-1 pathway. *Cell Signal* 13, 119-123.
- Boshra, H., Li, J. and Sunyer, J.O. (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 20(2), 239-62.
- Bougrier, S., Tige, G., Bachere, E. and Grizel, H. (1986) *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. *Aquaculture* 58(1-2), 151-154.
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M. and Moraga, D. (2003) Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8(1), 76-85.
- Bowie, A. and O'Neill, L.A. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67(4), 508-14.
- Bozdech, Z., Zhu, J., Joachimiak, M.P., Cohen, F.E., Pulliam, B. and DeRisi, J.L. (2003) Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol* 4(2), R9.
- Bréhelin, M., Bonami, J.-R., Cousserand, F. and Vivarès, C.P. (1982) Existence de formes plasmodiales vraies chez *Bonamia ostreae* parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*. *Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris* 295(Série III), 45-48.
- Breish, L.L. and Kennedy, J.S. (1980) A selected bibliography of wereldwijde oyster litterature. Maryland Sea. Grant publication, Maryland: p. 309.
- Brennan, C.A. and Anderson, K.V. (2004) Drosophila: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol* 22, 457-83.
- Brew, K., Dinakarparndian, D. and Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2), 267-83.
- Brown, G.D. and Reece, K.S. (2003) Isolation and characterization of serine protease gene(s) from *Perkinsus marinus*. *Dis Aquat Organ* 57(1-2), 117-26.
- Buckley, B.A., Owen, M.E. and Hofmann, G.E. (2001) Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *J Exp Biol* 204(Pt 20), 3571-9.
- Bulet, P., Stocklin, R. and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198, 169-84.
- Burreson, E.M., Stokes, N.A., Carnegie, R.B. and Bishop, M.J. (2004) *Bonamia sp.* (Haplosporidia) Found in Nonnative Oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *Journal of Aquatic Animal Health* 16(1), 1-9.
- Butcher, B.A., Kim, L., Johnson, P.F. and Denkers, E.Y. (2001) *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J Immunol* 167(4), 2193-201.

- Butt, D. and Raftos, D. (2008) Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Dev Comp Immunol* 32(3), 299-306.
- Caceres-Martinez, J., Robledo, J.A.F. and Figueras, A. (1995) Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). *Aquaculture*. 130(2), pp. 15-23.
- Campalans, M., Rojas, P. and Gonzalez, M. (2000) Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. Weymouth [Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.]. Vol. 20(no. 1), pp. 31-33.
- Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. and Villalba, A. (1997a) Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol* 70(2), 96-105.
- Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. and Villalba, A. (1997b) Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 127-135.
- Carballal, M.J., Villalba, A. and Lopez, C. (1998) Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol* 72(3), 304-12.
- Carnegie, R.B., Barber, B.J., Culloty, S.C., Figueras, A.J. and Distel, D.L. (2000) Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Diseases of Aquatic Organisms* 42(3), 199-206.
- Carnegie, R.B., Barber, B.J. and Distel, D.L. (2003) Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent in situ hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 55(3), 247-252.
- Carnegie, R.B., Burreson, E.M., Hine, P.M., Stokes, N.A., Audemard, C., Bishop, M.J. and Peterson, C.H. (2006) *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a Parasite of the Oyster *Ostreola equestris*, is the First *Bonamia* Species Known to Produce Spores. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 53(4), 232-245.
- Carruthers, V.B. and Sibley, L.D. (1999) Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 31(2), 421-8.
- Cavalier-Smith, T. and Chao, E.E. (2003) Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* 154(3-4), 341-58.
- Chagot, D. (1989) Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude in vitro de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Asctospora). Thèse du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Ecole Pratique des Hautes Etudes de Montpellier.
- Chagot, D., Boulo, V., Hervio, D., Mialhe, E., Bachere, E., Mourton, C. and Grizel, H. (1992) Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *Journal of Invertebrate Pathology [J. INVERTEBR. PATHOL.]* 59(3), pp. 241-249.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hétru, C., Hoffmann, J.A. and Bulet, P. (1996) Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 271, 21808-21813.
- Chen, J.H. and Bayne, B.L. (1995) Bivalve mollusc hemocyte behaviours: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*). *Biological Bulletin* 188, 255-266.
- Chen, X.M., Gores, G.J., Paya, C.V. and LaRusso, N.F. (1999) *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *Am J Physiol* 277(3 Pt 1), G599-608.
- Chen, X.M., Levine, S.A., Tietz, P., Krueger, E., McNiven, M.A., Jefferson, D.M., Mahle, M. and LaRusso, N.F. (1998) *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism. *Hepatology* 28(4), 906-13.
- Cheng, T.C. (1981) Bivalves. Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (eds) *Invertebrate Blood Cells I*. Academic Press, London., 233-299.
- Cheng, T.C. (1983) The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoology* 23, 129-144.
- Cheng, T.C. (1987) Some Cellular Mechanisms Governing Self and Nonself Recognition and Pathogenicity in Vertebrates and Invertebrates Relative to Protistan Parasites. *Aquaculture* 67, 1-14.
- Cheng, T.C. (1990) Effects of *in vivo* exposure of *Crassostrea virginica* to heavy metals on hemocyte viability and activity levels of lysosomal enzymes. . Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (eds). Academic Press, San Diego, CA, Academic Press, San Diego, CA., 513-524.
- Cheng, T.C. (1996) Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E. & Eble, F. (eds) *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park., 299-333.
- Cheng, T.C. and Howland, H. (1979) Chamotactic attraction between hemocytes of oyster, *Crassostrea virginica*, and bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 33, 204-210.
- Cheng, T.C. and Howland, H. (1982) Effect of colchicine and cytochalasin B on chemotaxis of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. . *J. Invertebr. Pathol.* 40, 150-152.

- Cheng, T.C. and Rifkin, E. (1970) Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes (S. F. Snieszko, ed). Am. Fish. Soc., Washington DC., 443-496.
- Cheng, T.C., Rodrick, G.E., Foley, D.A. and Koehler, S.A. (1975) Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. J Invertebr Pathol 25(2), 261-5.
- Cheng, T.C. and Rudo, B.M. (1976) Chemotactic attraction of *Crassostrea virginica* hemolymph cells to *Staphylococcus lactus*. J Invertebr Pathol 27(1), 137-9.
- Chu, F.-L.E. (2000) Defense mechanisms of marine bivalves. Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and pathology. M. Fingerman and R. Nagabhushanam. Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, Sciences publishers. 1-42.
- Chu, F.L.E. and La Peyre, J.F. (1989) Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). J. Invertebr. Pathol. 54, 224-232.
- Chuenkova, M.V. and Pereira, M.A. (2000) A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis in neuronal cells. Mol. Biol. Cell. 11, 1487-1498.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G. and Ballarin, L. (2000) Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. Fish Shellfish Immunol 10(8), 677-93.
- Cochennec, N. and Mazurie, J. (1992) Effets du parasite *Bonamia ostreae* sur la reproduction des huîtres plates *Ostrea edulis* en Bretagne, France. Pamaq V.
- Cochennec Laureau, N., Auffret, M., Renault, T. and Langlade, A. (2003) Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. Journal of Invertebrate Pathology 83(1), 23-30.
- Cochennec, N. (2001) *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*: sa position taxonomique parmi les parasites du groupe "microcell", analyses des interactions hôtes/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse de Doctorat Universitaire en Biologie cellulaire, Université de La Rochelle., 211.
- Cochennec, N., Le Roux, F., Berthe, F. and Gerard, A. (2000) Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. Journal of Invertebrate Pathology 76(1), 26-32.
- Cochennec, N., Renault, T., Boudry, P., Chollet, B. and Gerard, A. (1998) *Bonamia*-like parasite found in the Suminoe oyster *Crassostrea rivularis* reared in France. Diseases of Aquatic Organisms [Dis. Aquat. Org.]. Vol. 34, no. 3.
- Coles, J.A. and Pipe, R.K. (1994) Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish & Shellfish Immunology 4, 337-352.
- Combes, C. (1995) Interactions durables, Ecologie et évolution du parasitisme. Ed Masson. 524p.
- Comps, M. (1970a) La Maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations processus de cicatrisation. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 34(1), 23-44.
- Comps, M. (1970b) Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 34(3), 317-326.
- Comps, M. (1983) Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des Mollusques bivalves marins. Thèse de doctorat d'Etat en Science Naturelle, Université de Montpellier., 128.
- Comps, M. and Duthoit, J.L. (1976) Virus infection associated with 'gill disease' of the Portuguese Oyster *Crassostrea angulata* Lmk. Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris (Série D) 283(14), 1595-1596.
- Conte, A. and Ottaviani, E. (1995) Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. FEBS Lett 365(2-3), 120-4.
- Cooper, D.N. and Barondes, S.H. (1999) God must love galectins; he made so many of them. Glycobiology 9(10), 979-84.
- Cooper, E.L. and Roch, P. (1986) Second-set allograft responses in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Kinetics and characteristics. Transplantation 41(4), 514-20.
- Corbeil, S., Arzul, I., Robert, M., Berthe, F.C.J., Besnard-Cochennec, N. and Crane, M.S.J. (2006) Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. Diseases of Aquatic Organisms 71, 81-85.
- Corporeau, C. and Auffret, M. (2003) In situ hybridisation for flow cytometry: a molecular method for monitoring stress-gene expression in hemolymph cells of oysters. Aquat Toxicol 64(4), 427-35.
- Culloty, S.C., Cronin, M.A. and Mulcahy, M.F. (2001) An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980). Aquaculture 199(3-4), 229-244.
- Culloty, S.C. and Mulcahy, M.F. (1992) An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* L. 4th internat. Colloq. Marine Aquaculture ; 17-21Sept., Vigo (Pontevedra), Spain.
- Culloty, S.C. and Mulcahy, M.F. (1996) Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. Aquaculture 144(1-3), pp. 53-63.
- Culloty, S.C., Novoa, B., Pernas, M., Longshaw, M., Mulcahy, M.F., Feist, S.W. and Figueras, A. (1999) Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. Diseases of Aquatic Organisms 37(1), 73-80.

- Das, G., Vohra, H., Rao, K., Saha, B. and Mishra, G.C. (1999) *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. *Scand J Immunol* 49(3), 307-10.
- De Zoysa, M., Nikapitiya, C., Moon, D.O., Whang, I., Kim, G.Y. and Lee, J. (2009) A novel Fas ligand in mollusk abalone: molecular characterization, immune responses and biological activity of the recombinant protein. *Fish Shellfish Immunol* 27(3), 423-32.
- Deaton, L.E., Jordan, P.J. and Dankert, J.R. (1999) Phenoloxidase activity in the hemolymph of bivalve mollusks. *Journal of Shellfish Research* 18, 223-226.
- Dermine, J.F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. and Desjardins, M. (2000) *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* 2(2), 115-26.
- Descoteaux, A., Matlashewski, G. and Turco, S.J. (1992) Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 149(9), 3008-15.
- Desjardins, M. and Descoteaux, A. (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 185(12), 2061-8.
- Dimopoulos, G. (2003) Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiol* 5(1), 3-14.
- Dinamani, P., Hine, P.M. and Jones, J.B. (1987) Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster, *Tiostrea lutaria*. *Diseases of Aquatic Organisms* 3, 37-44.
- Dobbin, C.A., Smith, N.C. and Johnson, A.M. (2002) Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide. *J Immunol* 169(2), 958-65.
- Dobrowolski, J.M., Carruthers, V.B. and Sibley, L.D. (1997a) Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 26(1), 163-73.
- Dobrowolski, J.M., Niesman, I.R. and Sibley, L.D. (1997b) Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil Cytoskeleton* 37(3), 253-62.
- Dong, Y., Taylor, H.E. and Dimopoulos, G. (2006) AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol* 4(7), e229.
- Doonan, I.J., Cranfield, H.J. and Michael, K.P. (1994) Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia: Ostreidae), in Foveaux Strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 28(4), pp. 335-344.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V. and Fourmaux, M.N. (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* 28(7), 1007-13.
- Duclermortier, P., Lardans, V., Serra, E., Trottein, F. and Dissous, C. (1999) *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins. *Parasitol Res* 85(6), 481-6.
- Elston, R.A., Farley, C.A. and Kent, M.L. (1986) Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2(1), pp. 49-54.
- Elston, R.A., Kent, M.L. and Wilkinson, M.T. (1987) Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 64(3), pp. 237-242.
- Escoubas, J.M., Briant, L., Montagnani, C., Hez, S., Devaux, C. and Roch, P. (1999) Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Lett* 453(3), 293-8.
- Faisal, M., MacIntyre, E.A., Adham, K.G., Tall, B.D., Kothary, M.H. and La Peyre, J.F. (1998) Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 121, 161-168.
- Faisal, M., Schafhauser, D.Y., Garreis, K.A., Elsayed, E. and La Peyre, J.F. (1999) Isolation and characterization of *Perkinsus marinus* proteases using bacitracin-sepharose affinity chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* 123B, 417-426.
- FAO. (2009) Aquaculture Production : Quantities 1950-2007. Fishstat Plus. <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp#Download>.
- Farley, C.A., Wolf, P.H. and Elston, R.A. (1988) A long-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bulletin* 86(3), pp. 581-594.
- Felts, S.J., Owen, B.A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D.B. and Toft, D.O. (2000) The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J. Biol. Chem.* 275, 3305-3312.
- Feng, S.Y. (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fisheries Society Special Publication* 18, 153-168.
- Figueras, A.J. (1991) *Bonamia* status and its effects in cultured flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 93(3), pp. 225-233.
- Fisher, S.W. (1986) Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehélin, M. (ed) *Immunity in Invertebrates*, Vol 3. Springer-Vrelag, Berlin Heidelberg., 25-35.

- Fisher, W.S., Auffret, M. and Balouet, G. (1987) Response of European flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture* 67, 179-190.
- Fisher, W.S. and Newell, R.I.E. (1986) Seasonal and environmental variation in protein and carbohydrate levels in the hemolymph from American oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Comp. Biochem. Physiol. A* 85, 365-372.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T. and Volety, A.K. (2003) Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquat Toxicol* 64(4), 375-91.
- Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P. and Huvet, A. (2008) Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* 410(1), 187-96.
- Ford, S.E. (1996) Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: Response to climate change? *J Shellfish Res* 15(1), 45-56.
- Ford, S.E. and Chintala, M.M. (2006) Northward expansion of a marine parasite: Testing the role of temperature adaptation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 339(2), 226-235.
- Ford, S.E., Kanaley, S.A. and Littlewood, D.T. (1993) Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J Invertebr Pathol* 61(1), 49-57.
- Ford, S.E. and Smolowitz, R. (2007) Infection dynamics of an oyster parasite in its newly expanded range. *Marine Biology* 151(1), 119-133.
- Freire-de-Lima, C.G., Nunes, M.P., Corte-Real, S., Soares, M.P., Previato, J.O., Mendonca-Previato, L. and DosReis, G.A. (1998) Proapoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by IFN-gamma. *J Immunol* 161(9), 4909-16.
- Friedman, C.S. and Perkins, F.O. (1994) Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, U.S.A. *Journal of Invertebrate Pathology* 64(3), 179-181.
- Fujita, T., Matsushita, M. and Endo, Y. (2004) The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 198, 185-202.
- Gaffney, P.M. and Bushek, D. (1996) Genetic aspects of disease resistance in oysters. *Journal of Shellfish Research* 15, 135-140.
- Gagnaire, B. (2005) Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*-Interactions entre environnement, mécanisme de défense et maladie infectieuses. Thèse de doctorat océanologie biologique et environnement marin, Université de La Rochelle. 377p.
- Gagnaire, B., Renault, T., Bouilly, K., Lapegue, S. and Thomas-Guyon, H. (2003) Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr Pharm Des* 9(2), 193-9.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O. and Renault, T. (2006a) Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference is sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 54, 606-616.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T. and Renault, T. (2006b) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* 22(1), 1-14.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H. and Renault, T. (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 16(4), 501-12.
- Gauthier, J.D. and Vasta, G.R. (1994) Inhibition of in vitro replication of the oyster parasite *Perkinsus marinus* by the natural iron chelators transferrin, lactoferrin, and desferrioxamine. *Developmental and Comparative Immunology* 18(4), 277-286.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60.
- Girard, S., Pérez-Agundez, J.A., Miossec, L. and Czerwinski, N. (2005) Recensement de la conchyliculture 2001 : Agreste cahiers n°1 - Paris : Agreste. 89.
- Goebel, S., Luder, C.G. and Gross, U. (1999) Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Med Microbiol Immunol* 187(4), 221-6.
- Goedken, M. and De Guise, S. (2004) Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol* 16(4), 539-52.
- Goedken, M., Morsey, B., Sunila, I. and De Guise, S. (2005) Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanisms by *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* 24(2), 487-496.
- Gonzalez, M. (2005) Etude de la réponse immunitaire de l'huître *Crassostrea gigas* : caractérisation et fonctions des protéines de reconnaissance aux LPS et d'effecteurs antimicrobiens." Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier II., 168.
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzon, D., Romestand, B., Fievet, J., Pugnieri, M., Roquet, F., Escoubas, J.M., Vandenbulcke, F., Levy, O., Saune, L., Bulet, P. and Bachere, E. (2007) Evidence of a

- bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. Proc Natl Acad Sci U S A 104(45), 17759-64.
- Gonzalez, V., Combe, A., David, V., Malmquist, N.A., Delorme, V., Leroy, C., Blazquez, S., Menard, R. and Tardieux, I. (2009) Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. Cell Host Microbe 5(3), 259-72.
- Gouletquer, P. and Heral, M. (1997) Marine molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. In U.S. Dep. Commer., NOAA Technical Report. NMFS. 129, 137-164.
- Green, T.J., Tom, J., Dixon, T.J., Devic, E., Adlard, R.D. and Barnes, A.C. (2009) Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. Fish Shellfish Immunol. 26, 799-810.
- Grizel, H. (1985a) Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- Grizel, H. (1985b) Prophylactic strategies and zootechnic measures recent advances ? Advances in Tropical aquaculture : Workshop held in Tahiti, French Polynesia. Actes Colloq. Ifremer. 9, 227-231.
- Grizel, H., Comps, M., Cousserans, F., Bonami, J.-R. and Vago, C. (1974) Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris t. 279(Série D), 783-785.
- Grizel, H., Comps, M., Raguene, D., Leborgne, Y., Tige, G. and Martin, A.G. (1982) Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les cotes de Bretagne. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 46(3), 209-225.
- Grizel, H., Mialhe, E., Chagot, D., Boulo, V. and Bachère, E. (1988) Major parasitic and pathological conditions : Bonamiosis : A model study of diseases in marine molluscs. Am.Fish.Soc. Spec. Publ. 18, 1-4.
- Gueguen, Y., Bernard, R., Julie, F., Paulina, S., Delphine, D.G., Franck, V., Philippe, B. and Evelyne, B. (2009) Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. Mol Immunol 46(4), 516-22.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguier, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E. and Escoubas, J.M. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. Gene 303, 139-45.
- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J.M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P. and Bachère, E. (2006) Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. J Biol Chem 281(1), 313-23.
- Gulka, G. and Chang, P.W. (1984) Host response to rickettsial infection in blue mussel, *Mytilus edulis* L. Journal of Fish Diseases 8, 319-323.
- Hall, B.F., Webster, P., Ma, A.K., Joiner, K.A. and Andrews, N.W. (1992) Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. J Exp Med 176(2), 313-25.
- Haskin, H.H. and Ford, S.E. (1978) Mortality pattern and disease resistance in Delaware Bay oysters. Proc. Natl. Shellfish. Assoc., Md, 68 : 80p.
- Haskin, H.H. and Ford, S.E. (1979) Development of resistance to *Minchinia nelsoni* (MSX) mortalities in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. Mar. Fish.Rew. , 54-63.
- Hauton, C., Hawkins, L.E. and Hutchinson, S. (1998) The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology 119, 619-623.
- Hauton, C., Hawkins, L.E. and Hutchinson, S. (2001) Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L). Fish Shellfish Immunol 11(2), 143-53.
- Hawkins, L.E., Brooks, J.D., Brooks, S. and Hutchinson, S. (1993) The effect of tidal exposure on aspects of metabolic and immunological activity in the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus). . Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 104, 225-228.
- Hayes, K.R. (1998) Ecological risk assessment for ballast water introductions : a suggested approach. ICES J. Mar. Sci. 55, 201-212.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. and Soudant, P. (2003) Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 293, 249-265.
- Helmby, H., Jonsson, G. and Troye-Blomberg, M. (2000) Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage Plasmodium chabaudi chabaudi AS. Infect Immun 68(3), 1485-90.

- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F.M., Favrel, P. and Cunningham, C. (2005) Structural and functional evidences for a type 1 TGF-beta sensu stricto receptor in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggest conserved molecular mechanisms controlling mesodermal patterning across bilateria. *Mech Dev* 122(5), 695-705.
- Herrbach, B. (1971) Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* linne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35(1), 79-87.
- Hervio, D. (1992) Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (Acestopora), protozoaire parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* (Bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de 3ème cycle en Biologie fondamentale et appliquée (Spécialité: Protistologie), Université de Clermont Ferrand, 170 pp.
- Hervio, D., Bachere, E., Boulo, V., Cochenec, N., Vuillemin, V., Le Coguic, Y., Cailletaux, G., Mazurie, J. and Mialhe, E. (1995) Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: Application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture* 132(3-4), pp. 183-194.
- Heussler, V.T., Kuenzi, P. and Rottenberg, S. (2001) Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* 31(11), 1166-76.
- Heussler, V.T., Machado, J., Jr., Fernandez, P.C., Botteron, C., Chen, C.G., Pearse, M.J. and Dobbelaere, D.A. (1999) The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13), 7312-7.
- Hibbetts, K., Hines, B. and Williams, D. (1999) An overview of proteinase inhibitors. *J Vet Intern Med* 13(4), 302-8.
- Hill, E.W., O'Gorman, G.M., Agaba, M., Gibson, J.P., Hanotte, O., Kemp, S.J., Naessens, J., Coussens, P.M. and MacHugh, D.E. (2005) Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. *Vet Immunol Immunopathol* 105(3-4), 247-58.
- Hine, P.M. (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 367-385.
- Hine, P.M., Diggles, B.K., Parsons, M.J.D., Pringle, A. and Bull, B. (2002) The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochenec-Laureau and Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). *Journal of Fish Diseases* 25(9), 545-554.
- Hine, P.M. and Wesney, B. (1994a) The functional cytology of *Bonamia sp.* (Haplosporidia) infecting oysters *Tiostrea chilensis*: An ultracytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms [DIS. AQUAT. ORG.]* 20(3), 207-217.
- Hine, P.M. and Wesney, B. (1994b) Interaction of phagocytosed *Bonamia sp.* (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 20(3), pp. 219-229.
- Hinsch, G.W. and Hunte, M. (1990) Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the american oyster. In *Pathology in marine Science* (F. O. Perkins, T. C. Cheng, eds). Academic Press., Inc., San Diego. 479-488.
- Hirunpetcharat, C. and Good, M.F. (1998) Deletion of Plasmodium berghei-specific CD4+ T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4), 1715-20.
- Hisaeda, H., Sakai, T., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Yasutomo, K., Good, R.A. and Himeno, K. (1997) Heat shock protein 65 induced by gamma delta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 159(5), 2375-81.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. and Ezekowitz, R.A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284(5418), 1313-8.
- Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.M. (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 3(2), 121-6.
- Hu, M.S., Schwartzman, J.D., Yeaman, G.R., Collins, J., Seguin, R., Khan, I.A. and Kasper, L.H. (1999) Fas-FasL interaction involved in pathogenesis of ocular toxoplasmosis in mice. *Infect Immun* 67(2), 928-35.
- Hughes, F.M., Foster, B., Grewal, S. and Sokolova, I.M. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol*.
- Hughes, T.K., Jr., Smith, E.M., Barnett, J.A., Charles, R. and Stefano, G.B. (1991) LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1. *Dev Comp Immunol* 15(3), 117-22.
- Hultmark, D. (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 15(1), 12-9.
- Humphries, J.E. and Yoshino, T.P. (2003) Cellular Receptors and Signal Transduction in Molluscan Hemocytes: Connections with the Innate Immune System of Vertebrates. *Integrative and Comparative Biology* 43, 305-312.
- Humphries, J.E. and Yoshino, T.P. (2006) *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products stimulate a p38 signalling pathway in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Int J Parasitol* 36(1), 37-46.
- Huvet, A., Herpin, A., Degremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F. and Cunningham, C. (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343(1), 211-20.

- Iakovleva, N.V., Gorbushin, A.M. and Zelck, U.E. (2006) Partial characterization of mitogen-activated protein kinases (MAPK) from haemocytes of the common periwinkle, *Littorina littorea* (Gastropoda: Prosobranchia). *Fish Shellfish Immunol* 20(4), 665-8.
- Javelaud, D. and Mauviel, A. (2004) Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 36(7), 1161-5.
- Jaziri, H. (1985) Biogéographie et polymorphisme enzymatique chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. 1758. Mémoire de DEA, USTL Montpellier. 40pp.
- Jiang, Y. and Wu, X. (2007) Characterization of a Rel/NF-kappaB homologue in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dev Comp Immunol* 31(2), 121-31.
- Kang, Y.-S., Kim, Y.-M., Park, K.-I., Kim Cho, S., Choi, K.-S. and Cho, M. (2006) Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 1119-1131.
- Katkansky, S.C., Dahlstrom, W.A. and Warner, R.W. (1969) Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. *California fish and game* 55(1), 69-74.
- Kawabata, S. and Tsuda, R. (2002) Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab lectins. *J Endotoxin Res* 8(6), 437-9.
- Kern, P., Dietrich, M., Hemmer, C. and Wellinghausen, N. (2000) Increased levels of soluble Fas ligand in serum in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 68(5), 3061-3.
- Khan, I.A., Matsuura, T. and Kasper, L.H. (1996) Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol* 8(6), 887-96.
- Kim, S.H. and Sharma, R.P. (2004) Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 196(1), 47-57.
- Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A.K., Greenhough, T.J., Reid, K.B., Sim, R.B. and Arlaud, G.J. (2004) C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol* 25(10), 551-61.
- Kishore, U. and Reid, K.B. (2000) C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49(1-2), 159-70.
- Kleeman, S.N., Adlard, R.D. and Lester, R.J. (2002) Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. *Int J Parasitol* 32(6), 767-84.
- Kroeck, M.A. and Montes, J. (2005) Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Diseases of Aquatic Organisms* 63(2-3), 231-235.
- Kuchel, R.P., Aladaileh, S., Birch, D., Vella, N. and Raftos, D.A. Phagocytosis of the protozoan parasite, *Marteilia sydneyi*, by Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. *J Invertebr Pathol* 104(2), 97-104.
- La Peyre, J.F., Chu, F.L. and Vogelbein, W.K. (1995a) In vitro interaction of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and Pacific oyster hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 19(4), 291-304.
- La Peyre, J.F., Chu, F.L.E. and Meyers, J.M. (1995b) Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immunology* 5(3), 179-190.
- La Peyre, J.F., Xue, Q.G., Itoh, N., Li, Y. and Cooper, R.K. Serine protease inhibitor cvSI-1 potential role in the eastern oyster host defense against the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev Comp Immunol* 34(1), 84-92.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C. and Nicolas, J.L. (2006) Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 30(4), 367-79.
- Lacoste, A., Cueff, A. and Poulet, S.A. (2002) P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate beta-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *J Cell Sci* 115(Pt 4), 761-8.
- Lacoste, A., De Cian, M.C., Cueff, A. and Poulet, S.A. (2001) Noradrenaline and alpha-adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *J Cell Sci* 114(Pt 19), 3557-64.
- Lallias, D. (2008) Genetic linkage mapping in the blue mussel *Mytilus edulis* and the European flat oyster *Ostrea edulis*, and the search for Quantitative Trait Loci of resistance to a disease in *O. edulis*. Thesis. University of Wales, Bangor. 352p.
- Lallias, D., Arzul, I., Heurtebise, S., Ferrand, S., Chollet, B., Robert, M., Beaumont, A., Boudry, P., Morga, B. and Lapègue, S. (2008) *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources* 21, 423-439.
- Lallias, D., Gomez-Raya, L., Haley, C.S., Arzul, I., Heurtebise, S., Beaumont, A.R., Boudry, P. and Lapegue, S. (2009a) Combining two-stage testing and interval mapping strategies to detect QTL for resistance to bonamiosis in the european flat oyster *Ostrea edulis*. *Mar Biotechnol* (NY) 11(5), 570-84.
- Lallias, D., Gomez-Raya, L., Haley, C.S., Arzul, I., Heurtebise, S., Beaumont, A.R., Boudry, P. and Lapègue, S. (2009b) Combining two-stage testing and interval mapping strategies to detect QTL for resistance to bonamiosis in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Mar Biotechnol* 11, 570-584.

- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. and Paillard, C. (2003) Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol* 15(3), 225-40.
- Le Bec, C., Mazurie, J., Cochennec, N. and le Coguic, Y. (1991) Influence of *Crassostrea gigas* mixed with *Ostrea edulis* on the incidence of *Bonamia* disease. *Aquaculture* 93(3), 263-271.
- Leguizamón, M.S., Mocetti, E., Garcia Rivello, H., Argibay, P. and Campetella, O. (1999) Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system *in vivo*. *J Infect Dis* 180(4), 1398-402.
- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quere, H., Rodet, F., Dubos, M.P. and Favrel, P. (2007) Cg-TGF-beta, a TGF-beta/activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev Comp Immunol* 31(1), 30-8.
- Lelong, C., Mathieu, M. and Favrel, P. (2000) Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Eur J Biochem* 267(13), 3986-93.
- Lepore, L.S., Roelvink, P.R. and Granados, R.R. (1996) Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol* 68(2), 131-40.
- Li, L., Qiu, L., Song, L., Song, X., Zhao, J., Wang, L., Mu, C. and Zhang, H. (2009) First molluscan TNFR homologue in Zhikong scallop: molecular characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol* 27(5), 625-32.
- Lie, K.J., Heyneman, D. and Lim, H.K. (1975) Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *Int J Parasitol* 5(6), 627-31.
- Lie, K.J., Jeong, K.H. and Heyneman, D. (1982) Further characterization of acquired resistance in *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 68(4), 529-31.
- Liesenfeld, O., Kosek, J.C. and Suzuki, Y. (1997) Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65(11), 4682-9.
- Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K. and O'Neill, L.A. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5(6), 446-58.
- Lingelbach, K. and Joiner, K.A. (1998) The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 11), 1467-75.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia Martinez, P. and Pipe, R.K. (1992) Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 112, 265-276.
- Lopes, M.F., da Veiga, V.F., Santos, A.R., Fonseca, M.E. and DosReis, G.A. (1995) Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol* 154(2), 744-52.
- Lopes, M.F., Nunes, M.P., Henriques-Pons, A., Giese, N., Morse, H.C., 3rd, Davidson, W.F., Araujo-Jorge, T.C. and DosReis, G.A. (1999) Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. *Eur J Immunol* 29(1), 81-9.
- Lopez-Flores, I., Suarez-Santiago, V.N., Longet, D., Saulnier, D., Chollet, B. and Arzul, I. (2007) Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. *Parasitology* 134, 1941-1948.
- Luder, C.G., Gross, U. and Lopes, M.F. (2001) Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* 17(10), 480-6.
- Luna-Gonzalez, A., Maeda-Martinez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F. and Robles-Mungaray, M. (2003) Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 15(4), 275-82.
- Lynch, S.A., Armitage, D.V., Coughlan, J., Mulcahy, M.F. and Culloty, S.C. (2007) Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Experimental Parasitology* 115, 359-368.
- Ma, H., Mai, K., Xu, W. and Liufu, Z. (2005) Molecular cloning of alpha2- macroglobulin in sea scallop *Chlamys farreri* (Bivalvia, Mollusca). *Fish Shellfish Immunol* 18(4), 345-9.
- Martin, A.G., Gerard, A., Cochennec, N. and Langlade, A. (1993a) Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae* : Assessment of the resistance of a first selected generation. *European Aquaculture Society Special Publication* 18, 545-554.
- Martin, A.G., Gérard, A., Cochennec, N. and Langlade, A. (1993b) Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of the resistance of a first selected generation. In: Barnabé G., Kestemont P. (Eds.), *Production, Environment and Quality*. Bordeaux Aquaculture 1992. *Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ. No. 18*, pp. 547-554.
- Martins, G.A., Cardoso, M.A., Aliberti, J.C. and Silva, J.S. (1998) Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol Lett* 63(2), 113-20.
- Matsumoto, J., Kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y., Aikawa, M. and Matsuda, H. (2000) Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia:

- possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of *Macaca* monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection. *Infect Immun* 68(3), 1183-8.
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M. and Takahashi, K.G. (2006) Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 145(3-4), 325-30.
- Matsushita, M., Matsushita, A., Endo, Y., Nakata, M., Kojima, N., Mizuochi, T. and Fujita, T. (2004) Origin of the classical complement pathway: Lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27), 10127-31.
- McCole, D.F., Eckmann, L., Laurent, F. and Kagnoff, M.F. (2000) Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 68(3), 1710-3.
- McCormick-Ray, M.G. and Howard, T. (1991) Morphology and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal variations. *J Invertebr Pathol* 58(2), 219-30.
- McDowell, M.A. and Sacks, D.L. (1999) Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. *Curr Opin Microbiol* 2(4), 438-43.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296(5566), 298-300.
- Mialhe, E., Bachere, E., Chagot, D. and Grizel, H. (1988) Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 71(4), pp. 293-299.
- Minchin, D., Duggan, C.B., Holmes, J.M.C. and Neiland, S. (1993) Introduction of exotic species associated with Pacific oyster transfers from France to Ireland. Council Meeting Paper, 11p.
- Minchin, D. and Sheehan, J. (1998) The significance of ballast water in the introduction of exotic marine organisms to Cork Harbour, Ireland. ICES, Copenhagen, ICES-CM-1995/0 :1, 15pp.
- Mirella da Silva, P., Comesana, P., Fuentes, J. and Villalba, A. (2008) Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish Shellfish Immunol* 24(5), 551-63.
- Mirella da Silva, P., Villalba, A. and Sunila, I. (2006) Branchial lesions associated with abundant apoptotic cells in oysters *Ostrea edulis* of Galicia (NW Spain). *Dis Aquat Organ* 70(1-2), 129-37.
- Mitta, G., Hubert, F., Noel, T. and Roch, P. (1999a) Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem* 265(1), 71-8.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. and Roch, P. (1999b) Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J Cell Sci* 112 (Pt 23), 4233-42.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. and Roch, P. (2000) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett* 486(3), 185-90.
- Mix, M.C. (1976) A general model for leucocyte cell renewal in bivalve molluscs. *Marine Fisheries Review*, 37-41.
- Montagnani, C., Avarre, J.C., de Lorgeril, J., Quiquand, M., Boulo, V. and Escoubas, J.M. (2007) First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev Comp Immunol* 31(1), 1-11.
- Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M. and Escoubas, J.M. (2004) Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett* 561(1-3), 75-82.
- Montagnani, C., Labreuche, Y. and Escoubas, J.M. (2008) Cg-IkappaB, a new member of the IkappaB protein family characterized in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 32(3), 182-90.
- Montes, J., Anadon, R. and Azevedo, C. (1994) A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *Journal of Invertebrate Pathology* 63(1), 1-6.
- Montes, J., Ferro Soto, B., Conchas, R.F. and Guerra, A. (2003) Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. *Aquaculture* 220(1-4), 175-182.
- Montes, J., Villalba, A., Lopez, M.C., Carballal, M. and Mourelle, S.G. (1991) Bonamiosis in native flat oyster, *Ostrea edulis* L., from two intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, N. W. Spain) with different histories of oyster culture. *Aquaculture* 93(3), 213-214.
- Moore, C.A. and Gelder, S.R. (1983) The role of the blunt granules in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* following phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.* 41, 369-377.
- Moore, C.A. and Gelder, S.R. (1985) Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca : Bivalvia). *Transactions of the American Microscopy Society* 104, 242-249.
- Moore, K.J. and Matlashewski, G. (1994) Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 152(6), 2930-7.
- Moore, K.J., Turco, S.J. and Matlashewski, G. (1994) *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. *J Leukoc Biol* 55(1), 91-8.

- Moraga, D., Meistertzheim, A.L., Tanguy-Royer, S., Boutet, I., Tanguy, A. and Donval, A. (2005) Stress response in Cu²⁺ and Cd²⁺ exposed oysters (*Crassostrea gigas*): an immunohistochemical approach. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141(2), 151-6.
- Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M. and Sibley, L.D. (1999) Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 190(12), 1783-92.
- Morisaki, J.H., Heuser, J.E. and Sibley, L.D. (1995) Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci* 108 (Pt 6), 2457-64.
- Morvan, A., Bachere, E., Da Silva, P.P., Pimenta, P. and Mialhe, E. (1994) In vitro activity of the antimicrobial peptide magainin 1 against *Bonamia ostreae*, the intrahemocytic parasite of the flat oyster *Ostrea edulis*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(6), 327-33.
- Morvan, A., Iwanaga, S., Comps, M. and Bachere, E. (1997) In Vitro Activity of the Limulus Antimicrobial Peptide Tachyplesin I on Marine Bivalve Pathogens. *J Invertebr Pathol* 69(2), 177-82.
- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P. and Snider, D. (2004) Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304(5668), 297-300.
- Mourton, C., Boulo, V., Chagot, D., Hervio, D., Bachere, E., Mialhe, E. and Grizel, H. (1992) Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): In vitro system establishment. *Journal of Invertebrate Pathology [J. INVERTEBR. PATHOL.]* 59(3), pp. 235-240.
- Naciri, Y. (1994) Sélection des mollusques : Bilan et nouvelles perspectives concernant la croissance, la qualité et les résistances aux maladies. Bordeaux Aquaculture, 54-61.
- Naciri-Graven, Y., Martin, A.G., Baud, J.P., Renault, T. and Gerard, A. (1998) Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 224(1), 91-107.
- Nandan, D. and Reiner, N.E. (1995) Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect Immun* 63(11), 4495-500.
- Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C. and Curiel, T.J. (1998) *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol* 160(4), 1824-30.
- Nell, J.A. and Hand, R.E. (2003) Evaluation of the progeny of second-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease *Marteilia sydneyi*. *Aquaculture [Aquaculture]*. 228(1-4), 27-35.
- Nell, J.A., Smith, I.R. and McPhee, C.C. (2000) The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850) breeding programme: progress and goals. *Aquaculture Research*. 31(1), pp. 45-49.
- Newton, K., Peters, R. and Raftos, D. (2004) Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Dev Comp Immunol* 28(6), 565-9.
- Nonaka, M. and Smith, S.L. (2000) Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish Shellfish Immunol* 10(3), 215-28.
- Nunes, M.P., Andrade, R.M., Lopes, M.F. and DosReis, G.A. (1998) Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4⁺ T lymphocytes from infected hosts. *J Immunol* 160(3), 1313-9.
- Nyholm, S.V., Passegue, E., Ludington, W.B., Voskoboynik, A., Mitchel, K., Weissman, I.L. and De Tomaso, A.W. (2006) fester, A candidate allorecognition receptor from a primitive chordate. *Immunity* 25(1), 163-73.
- Ojcius, D.M., Perfettini, J.L., Bonnin, A. and Laurent, F. (1999) Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. *Microbes Infect* 1(14), 1163-8.
- Olafsen, J.A., Fletcher, T.C. and Grant, P.T. (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev Comp Immunol* 16(2-3), 123-38.
- Olivier, M., Brownsey, R.W. and Reiner, N.E. (1992) Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16), 7481-5.
- Opitz, C. and Soldati, D. (2002) 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 45(3), 597-604.
- Orlofsky, A., Somogyi, R.D., Weiss, L.M. and Prystowsky, M.B. (1999) The murine antiapoptotic protein A1 is induced in inflammatory macrophages and constitutively expressed in neutrophils. *J Immunol* 163(1), 412-9.
- Ottaviani, E., Paeman, L.R., Cadet, P. and Stefano, G.B. (1993) Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur J Pharmacol* 248(4), 319-24.
- Paillard, C., Allam, B. and Oubella, R. (2004) Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Organ* 59(3), 249-62.

- Pascual, M., Martin, A.G., Zampatti, E., Coatanea, D., Defosse, J. and Robert, R. (1991) Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. International Council for the Exploration of the Sea C.M. 1991/K:30, 17 pp.
- Perkins, F.O. (1979) Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera Minchinia, Urosporidium, Haplosporidium, and, Marteilia – taxonomic implications. Mar. Fish Rev. 41, 25-37.
- Perkins, F.O. and Wolf, P.H. (1976) Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. N.- Haplosporidan pathogen of Australian oysters. The Journal of Parasitology 62(4), 528-538.
- Perrigault, M., Tanguy, A. and Allam, B. (2009) Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to *quahog parasite unknown* (QPX). BMC Genomics 10, 377.
- Perroquin, M. (1995) Mise au point d'une technique de primocultures d'hémocytes d'huître plate, *Ostrea edulis*. Rapport de stage, formation complémentaire post B.T.S., Lycée technique Saint-Louis, Bordeaux. 49 pp.
- Peters, R. and Raftos, D.A. (2003) The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Aquaculture 223, 29-39.
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F. and Fabbri, E. (2002) Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. Cell Stress Chaperones 7(3), 250-7.
- Piano, A., Franzellitti, S., Tinti, F. and Fabbri, E. (2005) Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Gene 361, 119-26.
- Piano, A., Valbonesi, P. and Fabbri, E. (2004) Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. Cell Stress Chaperones 9(2), 134-42.
- Pichot, Y., Comps, M., Tige, G., Grizel, H. and Rabouin, M.A. (1979) Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* L. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 43(1), 131-140.
- Pipe, R.K. (1990a) Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Cell and Tissue Research 261, 261-268.
- Pipe, R.K. (1990b) Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem J 22(11), 595-603.
- Pipe, R.K. (1992) Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev Comp Immunol 16(2-3), 111-22.
- Pipe, R.K., Porte, C. and Livingstone, D.R. (1993) Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. Fish & Shellfish Immunology 3, 221-233.
- Porte, C., Sole, M., Albaiges, J. and Livingstone, D.R. (1991) Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus sp.* to organic pollution. Comp Biochem Physiol C 100(1-2), 183-6.
- Qiu, L., Song, L., Xu, W., Ni, D. and Yu, Y. (2007) Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol 22(5), 451-66.
- Rabinovich, G.A. and Gruppi, A. (2005) Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. Parasite Immunol 27(4), 103-14.
- Raftos, D.A., Bult, D. and Bozemer, B. (2004) Phenoloxidase analysis of Pacific oysters., Australian Seafood Industries p 3-5.
- Reece, K.S., Siddall, M.E., Stokes, N.A. and Burrenson, E.M. (2004) Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. J Parasitol 90(5), 1111-22.
- Renault, T., Cochenec, N. and Grizel, H. (1995) *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 15(3), 78-80.
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Salomieu, V., Moreau, K., Brunetière, C. and Pépin, J.F. (2007) Expression analysis of immune-relevant genes identified in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* by subtractive suppression hybridization. World Aquaculture Society, February 26 to March 2, 2007, San Antonio TEXAS, USA.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Chollet, B., Cochenec, N. and Gerard, A. (2000) Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Diseases Of Aquatic Organisms 42(3), 173.
- Rittig, M.G. and Bogdan, C. (2000) Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. Parasitol Today 16(7), 292-7.
- Robert, M., Garcia, C., Chollet, B., Lopez-Flores, I., Ferrand, S., Francois, C., Joly, J.P. and Arzul, I. (2009) Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. Mol Cell Probes 23(6), 264-71.
- Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J. and Goetz, F. (2008) Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. Dev Comp Immunol 32(9), 1099-104.
- Roch, P. (1999) Defense mechanism and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture 172, 125-145.

- Rodriguez, A., Rioult, M.G., Ora, A. and Andrews, N.W. (1995) A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* 129(5), 1263-73.
- Rodriguez, A., Samoff, E., Rioult, M.G., Chung, A. and Andrews, N.W. (1996) Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* 134(2), 349-62.
- Rodriguez, A., Webster, P., Ortego, J. and Andrews, N.W. (1997) Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 137(1), 93-104.
- Rogan, E., Culloty, S.C., Corss, T.F. and Mulcahy, M.F. (1991) The detection of *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980) in frozen oysters (*Ostrea edulis* L.) and the effect of the parasite on condition. *Aquaculture* 97(4), pp. 311-315.
- Roubal, F.R., Masel, J. and Lester, R.J.G. (1989) Studies on *Marteilia sydneyi*, agent of QX disease in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. *AUST. J. MAR. FRESHWAT. RES.* 40(2), 155-167.
- Rowley, A.F. and Powell, A. (2007) Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *J Immunol* 179(11), 7209-14.
- Roxstrom-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E. and Svard, S.G. (2006) Giardia immunity--an update. *Trends Parasitol* 22(1), 26-31.
- Ruiz, G.M., Rawlings, T.K., Dobbs, F.C., Drake, L.A., Mullady, T., Huq, A. and Colwell, R.R. (2000) Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408(6808), 49-50.
- Sacks, D. and Sher, A. (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3(11), 1041-7.
- Sakai, T., Hisaeda, H., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Zhang, M., Nakao, Y., Takeuchi, T., Matsumoto, K., Good, R.A. and Himeno, K. (1999) Expression and role of heat-shock protein 65 (HSP65) in macrophages during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of HSP65 in prevention of apoptosis of macrophages. *Microbes Infect* 1(6), 419-27.
- Scheeweib, H. and Renwartz, L. (1993) Analysis of the attraction of hemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 377-387.
- Schmid-Hempel, P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu Rev Entomol* 50, 529-51.
- Schulenburg, H., Boehnisch, C. and Michiels, N.K. (2007) How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol Immunol* 44(13), 3338-44.
- Schwarzer, E., Turrini, F., Giribaldi, G., Cappadoro, M. and Arese, P. (1993) Phagocytosis of *P. falciparum* malarial pigment hemozoin by human monocytes inactivates monocyte protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1181(1), 51-4.
- Schwarzer, E., Turrini, F., Ulliers, D., Giribaldi, G., Ginsburg, H. and Arese, P. (1992) Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* 176(4), 1033-41.
- Seo, J.K., Crawford, J.M., Stone, K.L. and Noga, E.J. (2005) Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem Biophys Res Commun* 338(4), 1998-2004.
- Shapira, S., Speirs, K., Gerstein, A., Caamano, J. and Hunter, C.A. (2002) Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 185 Suppl 1, S66-72.
- Siah, A., Dohoo, C., McKenna, P., Delaporte, M. and Berthe, F.C. (2008) Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*. *Fish Shellfish Immunol* 25(3), 202-7.
- Sibley, L.D. (2004) Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 304(5668), 248-53.
- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., Pemberton, P.A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G.S., Travis, J. and Whisstock, J.C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 276(36), 33293-6.
- Sire, C., Rognon, A. and Theron, A. (1998) Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology* 117 (Pt 2), 117-22.
- Slack, J.L., Schooley, K., Bonnert, T.P., Mitcham, J.L., Qvarnstrom, E.E., Sims, J.E. and Dower, S.K. (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275(7), 4670-8.
- Sminia, T., Van der Knapp, W.P.W. and Van Asselt, L.A. (1983) Blood cell types and blood cell formation in gasteropod molluscs. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 665-668.
- Snieszko, S.F. (1974) The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6, 197-208.
- Soares-da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R. and Machado, J. (2002) Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132(3), 541-53.

- Soares-da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R., Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D. and Gouilletquer, P. (1998) Hydrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. 386: 131-146.
- Soderhall, K. and Cerenius, L. (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 10(1), 23-8.
- Soderhall, K. and Smith, V.J. (1983) Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol* 7(2), 229-39.
- Sole, M., Porte, C. and Albaiges, J. (1994) Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens. *Aquatic Toxicology* 30, 271-283.
- Sunila, I. and LaBanca, J. (2003) Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases Of Aquatic Organisms* 56(2), 163-170.
- Tanguy, A., Guo, X. and Ford, S.E. (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338(1), 121-131.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E. and Andrews, N.W. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71(7), 1117-30.
- Tasumi, S. and Vasta, G.R. (2007) A Galectin of Unique Domain Organization from Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Is a Receptor for the Protistan Parasite *Perkinsus marinus*. *J Immunol* 179(5), 3086-98.
- Tige, G. and Grizel, H. (1984) Experimental contamination of *Ostrea edulis* Linne by *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1979) in Crach River (Morbihan). *Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes Nantes*. 46(4), 307-314.
- Tige, G., Grizel, H., Rabouin, M.A., Cochonnec, N., Audc, G. and Langlade, A. (1982) Hemocytary disease of the common oyster caused by *Bonamia ostreae* : evolution of the epizootiologic state during 1981. *SCI. PECHE*. 328, pp. 3-13.
- Tirape, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandenbulcke, F. and Boulo, V. (2007) Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev Comp Immunol* 31(9), 859-73.
- Tirard, C.T., Grossfeld, R.M., Levine, J.F. and Kennedy-Stoskopf, S. (1997) Effect of osmotic shock on protein synthesis of oyster hemocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 116, 43-49.
- Tom Tang, Y., Hu, T., Arterburn, M., Boyle, B., Bright, J.M., Palencia, S., Emtage, P.C. and Funk, W.D. (2005) The complete complement of C1q-domain-containing proteins in *Homo sapiens*. *Genomics* 86(1), 100-11.
- Torreilles, J., Guerin, M.C. and Roch, P. (1996) Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III - Sciences de la Vie -Life* 319: 209-218. .
- Torreilles, J., Guerin, M.C. and Roch, P. (1997) Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 21, 267-275.
- Tourancheau, A. (2009) Mécanisme de défense anti-viraux chez l'huître creuse : suivie de l'expression de gènes interprétés comme impliqués dans l'immunité.
- Toure-Balde, A. and al., e. (2000) Apoptosis modulation in mononuclear cells recovered from individuals exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Parasite Immunol* 22, 307-318.
- Rapport de 2ème année IUT La Rochelle. 31p.
- Toure-Balde, A. and al., e. (1995) Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol. Lett.* 46, 59-62.
- Toure-Balde, A., Sarthou, J.L., Aribot, G., Michel, P., Trape, J.F., Rogier, C. and Roussilhon, C. (1996) *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun* 64(3), 744-50.
- Van Banning, P. (1991) Observation on bonamiosis in the stock of the European flat oysters, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 93, 205-211.
- Van Banning, P. (1990) The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 84, 189-192.
- Van Banning, P. (1987) Effect of cleaning an oyster area and ceasing oysters plantings qs control measure of bonamiosis in the dutch oyster culture. Meeting. Ifremer, La Tremblade, 27-29 april.
- Van den Berg, R.H., Faber-Krol, M.C., Sim, R.B. and Daha, M.R. (1998) The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 161(12), 6924-30.
- Vasta, G.R. (2009) Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol* 7(6), 424-38.
- Vasta, G.R. and Ahmed, H. (1996) Animal lectins as cell surface receptors: current status for invertebrate species. *Prog Mol Subcell Biol* 17, 158-82.

- Vasta, G.R., Ahmed, H., Fink, N.E., Elola, M.T., Marsh, A.G., Snowden, A. and Odom, E.W. (1994) Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution. *Ann N Y Acad Sci* 712, 55-73.
- Volety, A.K. and Chu, F.L. (1995) Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev Comp Immunol* 19(2), 135-42.
- Wang, N., Whang, I. and Lee, J. (2008) A novel C-type lectin from abalone, *Haliotis discus discus*, agglutinates *Vibrio alginolyticus*. *Dev Comp Immunol* 32(9), 1034-40.
- Watson, F.L., Puttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I. and Schmucker, D. (2005) Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* 309(5742), 1874-8.
- Woolsey, A.M., Sunwoo, L., Petersen, C.A., Brachmann, S.M., Cantley, L.C. and Burleigh, B.A. (2003) Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci* 116(Pt 17), 3611-22.
- Xiong, X., Feng, Q., Chen, L., Xie, L. and Zhang, R. (2008) Cloning and characterization of an IKK homologue from pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Dev Comp Immunol* 32(1), 15-25.
- Xu, X., Sumita, K., Feng, C., Xiong, X., Shen, H., Maruyama, S., Kanoh, M. and Asano, Y. (2001) Down-regulation of IL-12 p40 gene in *Plasmodium berghei*-infected mice. *J Immunol* 167(1), 235-41.
- Xue, Q. (1998) Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 324 p.
- Xue, Q., Hellberg, M.E., Schey, K.L., Itoh, N., Eytan, R.I., Cooper, R.K. and La Peyre, J.F. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evol Biol* 10(1), 213.
- Xue, Q. and Renault, T. (2001) Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Dev Comp Immunol* 25(3), 187-94.
- Xue, Q.G. and Renault, T. (2000) Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology* 76(3), 155-163.
- Yamada, M., Oritani, K., Kaisho, T., Ishikawa, J., Yoshida, T. and Takahashi, I. (2004) Complement C1q regulates PLS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 34, 221-230.
- Yeaman, M.R. and Yount, N.Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55(1), 27-55.
- Yigzaw, Y., Gielens, C. and Preaux, G. (2001) Isolation and characterization of an alpha-macroglobulin from the gastropod mollusc *Helix pomatia* with tetrameric structure and preserved activity after methylamine treatment. *Biochim Biophys Acta* 1545(1-2), 104-13.
- Zelck, U.E., Gege, B.E. and Schmid, S. (2007) Specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase and PI3-K pathways impair immune responses by hemocytes of trematode intermediate host snails. *Dev Comp Immunol* 31(4), 321-31.
- Zhang, D., Jiang, S., Qiu, L., Su, T., Wu, K., Li, Y., Zhu, C. and Xu, X. (2009) Molecular characterization and expression analysis of the IkappaB gene from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol* 26(1), 84-90.
- Zhang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Wang, H. and Qiu, L. (2008a) A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity. *Fish Shellfish Immunol* 25, 281-289.
- Zhang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Wang, H., Qiu, L., Ni, D. and Zhang, Y. (2008b) A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity. *Fish Shellfish Immunol* 25(3), 281-9.
- Zhang, S.M., Adema, C.M., Kepler, T.B. and Loker, E.S. (2004) Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* 305(5681), 251-4.

-Index des figures-

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Schéma des interactions hôte/pathogène/parasite (modifié d'après Sniesko,1974) | 2 |
| Figure 2 : Modèle d'étude des interactions hôte (huître plate)/parasite (<i>Bonamia ostreae</i>) | 5 |
| Figure 3 : Production en tonnes des principaux coquillages en France (CNC 2009) (http://www.cnc-france.com) | 10 |
| Figure 4 : Production d'huître creuse et de moule de bouchot en 2009 dans les principaux sites d'élevage (CNC 2009) | 10 |
| Figure 5 : Historique de la production d'huître plate en France (FAO) | 14 |
| Figure 6 : Distribution géographique de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i> (d'après Jaziri 1985) | 15 |
| Figure 7 : Cycle de reproduction de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i> (com. Per. Estelle Harrang) (Photos Estelle Harrang) | 17 |
| Figure 8 : Filets tubulaires avec des coquilles de moules utilisées comme collecteurs de naissain (source FAO) | 18 |
| Figure 9 : Zootechnie de l'huître plate (source FAO) | 19 |
| Figure 10 : modèle général d'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves proposé par Mix (1976) | 22 |
| Figure 11 : modèle général d'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves proposé par Cheng (1981) | 22 |
| Figure 12 : Population hémocytaire chez l'huître plate <i>Ostrea edulis</i> colorée à Hémacolor® | 22 |
| Figure 13 : Hémocytes d'huître plate <i>Ostrea edulis</i> fraîchement extraits et observés sur cellule de Malassez (x 400) (Photos B. Chollet) | 24 |
| Figure 14 : (A) Coupe histologique illustrant une infiltration hémocytaire chez <i>Ostrea edulis</i> associée à l'infection par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> (x 100). (B) Coupe histologique d'une huître plate saine sans infiltration hémocytaire (x 100) (Photos B. Chollet) | 27 |
| Figure 15 : Mécanisme général de la phagocytose et de l'encapsulation | 28 |
| Figure 16 : Conservation de la voie NF- κ B chez les vertébrés, la drosophile et chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (Montagnani <i>et al.</i> , 2004) | 33 |

| | |
|--|----|
| Figure 17 : Internalisation du parasite <i>Bonamia ostreae</i> par un hémocyte d'huître plate <i>Ostrea edulis</i> (ps : pseudopodes, B.o : <i>Bonamia ostreae</i>) Microscopie électronique x 20000 JEOL JEM 1200 EX (Chagot, 1989) | 34 |
| Figure 18 : Mécanisme de dégradation des particules phagocytées (d'après Xue, 1998) | 36 |
| Figure 19 : Représentation des effets directs du parasite dans la mort de la cellule hôte | 40 |
| Figure 20 : Représentation des mécanismes indirects de la mort cellulaire au cours d'une infection par des parasites intracellulaire | 40 |
| Figure 21 : Modèle simplifié des voies de signalisation pouvant induire ou inhiber l'apoptose (modifiée d'après Lüder <i>et al.</i> , 2001) | 42 |
| Figure 22 : Activation de la cascade phénoloxydase chez les invertébrés (d'après Söderhäll & Cerenius 1998) | 44 |
| Figure 23 : Mécanisme de la réponse immunitaire spécifique par l'intermédiaire des PRPs (modifiée d'après Rowley <i>et al.</i> , 2007) | 57 |
| Figure 24 : Répartition des ESTs (Express Sequences Tags) disponibles dans la base donnée NCBI | 58 |
| Figure 25 : (A) Observation du parasite <i>Bonamia ostreae</i> extracellulaire (Bo Ec) (x 1000). B Observation de plasmodes (pl) (x 1000). (Photos B. Chollet) | 60 |
| Figure 26 : Ultrastructure du parasite <i>Bonamia ostreae</i> | 60 |
| Figure 27 : Classification phylogénétique de <i>Bonamia ostreae</i> sur la base de la séquence de la sous unité ribosomale de l'ADNr (Reece <i>et al.</i> , 2004) | 64 |
| Figure 28 : Coupe histologique colorée à l'hématoxyline (x 600) (Photos B.Chollet) | 69 |
| Figure 29 : Appositions de tissus cardiaque colorées à l'hémacolor® (x 1000) (Photos B.Chollet) | 69 |
| Figure 30 : Quel avantage à la vie parasitaire ? (modifiée d'après Combes, 1995) | 72 |
| Figure 31 : Quatre obstacles à la réalisation d'un système hôte-parasite | 75 |
| Figure 32 : Etude des différents cas possible dans l'établissement d'un système hôte-parasite (Combes, 1995) | 75 |
| Figure 33 : Exemples d'internalisation de parasite intracellulaire dans une cellule de type macrophage (modifiée d'après Sacks & Sher, 2002) | 78 |
| Figure 34 : Pénétration de <i>Trypanosoma cruzi</i> dans la cellule hôte | 79 |
| Figure 35 : Représentation schématique des principales étapes de l'invasion des tachyzoïtes de toxoplasma dans la cellule hôte | 80 |

| | |
|--|-----|
| Figure 36 : Inhibition des voies de signalisation chez les macrophages infectés par <i>Leishmania sp.</i> , <i>Plasmodium sp.</i> et <i>Toxoplasma sp.</i> (modifiée d'après Sacks & Sher 2002) | 84 |
| Figure 37 : Alignement des séquences protéiques d'OeMyD88 chez <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Crassostrea gigas</i> , <i>Crassostrea ariakensis</i> , <i>Chlamys farreri</i> | 186 |
| Figure 38 : Séquence du gène OeMyD88 | 187 |
| Figure 39 : Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) des séquences d'acides aminés MyD88 provenant de diverses espèces | 188 |
| Figure 40 : Séquence du gène OeC1q | 192 |
| Figure 41 : Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) des séquences d'acides aminés provenant de diverses espèces contenant le domaine C1q | 191 |
| Figure 42 : Analyse des activités enzymatiques dans le plasma | 270 |
| Figure 43 : Analyse des activités enzymatiques dans l'hémolymphe | 270 |
| Figure 44 : Analyse des activités enzymatiques dans les hémocytes | 270 |
| Figure 45 : Synthèse des différentes études pour la caractérisation des interactions entre hémocytes d'huîtres plates et son parasite <i>Bonamia ostreae</i> | 272 |
| Figure 46 : Schéma récapitulatif des interactions hôte/parasite observées chez des hémocytes d' <i>Ostrea edulis</i> après deux heures d'infection <i>in vitro</i> par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> | 277 |
| Figure 47 : Schéma récapitulatif de la réponse cellulaire et moléculaire des hémocytes d'huîtres plates infectés par le parasite après 1h, 2h, 4h et 8h de mise en contact avec <i>Bonamia ostreae</i> | 280 |
| Figure 48 : Schéma de synthèse des mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance à la bonamiose (<i>in vitro</i>) | 283 |

-Index des tableaux-

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Systématique de l'huître plate, <i>Ostrea edulis</i> | 15 |
| Tableau 2 : Induction ou inhibition de l'apoptose chez les cellules hôtes par des parasites intracellulaires | 42 |
| Tableau 3 : Exemples de parasites intracellulaires : stratégies de pénétration intracellulaire (modifié d'après Sibley, 2004) | 79 |

Annexes

Annexe 1

Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*.

Arzul Isabelle, Gagnaire Béatrice, Bond Céline, Chollet Bruno, Morga Benjamin, Ferrand Sylvie, Robert Maeva, Renault Tristan. Dis Aquat Organ. 2009 May 27;85(1):67-75.

Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*

Isabelle Arzul^{1,*}, Béatrice Gagnaire², Céline Bond¹, Bruno Chollet¹, Benjamin Morga¹, Sylvie Ferrand¹, Maeva Robert¹, Tristan Renault¹

¹Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

²Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology, DEI/SECURE/LRE, Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Cadarache, Building 186, BP 3, 13115 St-Paul-lez-Durance Cedex, France

ABSTRACT: Bonamiosis due to the intrahaemocytic protistan parasite *Bonamia ostreae* is a European endemic disease affecting the flat oyster *Ostrea edulis*. The parasite has been described in various ecosystems from estuaries to open sea, but no clear correlation has yet been demonstrated between disease development and environmental parameters. In this study, the effect of temperature and salinity on the survival of purified parasites maintained *in vitro* in seawater was investigated by flow cytometry. Purified parasites were incubated in various seawater media (artificial seawater, natural seawater, seabed borewater) at various temperatures (4, 15 and 25°C) and subjected to a range of salinities from 5 to 45 g l⁻¹. Parasites were collected after 12, 24 and 48 h of incubation for flow cytometry analyses including estimation of parasite mortality and parasite viability through detection of non-specific esterase activities. Artificial seawater appeared unsuitable for parasite survival, and results for all media showed a significantly lower survival at 25°C compared to 4°C and 15°C. Moreover, high salinities (≥35 g l⁻¹) favoured parasite survival and detection of esterase activities. Flow cytometry appears to be a suitable technique to investigate survival and activities of unicellular parasites like *B. ostreae* under varied conditions. Although these results contribute to a better understanding of existing interactions between the parasite *B. ostreae* and its environment, validation through epidemiological surveys in the field is also needed.

KEY WORDS: *Bonamia ostreae* · Flow cytometry · *In vitro* assays · Cell viability · Temperature tolerance · Salinity tolerance

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Bonamia ostreae is a protistan parasite belonging to the phylum Haplosporidia (Sprague 1979). It is an intracellular parasite, 2 to 5 µm in diameter, that infects haemocytes. It can also be observed extracellularly between epithelial or interstitial cells in gills and stomach or in necrotic connective tissue areas. The parasite can be detected in spat (Lynch et al. 2005); however, mortalities mainly affect oysters that are more than 2 yr old (Culloty & Mulcahy 1996). At the tissue level, the infection is usually associated with intense haemocyte

infiltration of the connective tissue of the gills, mantle and digestive gland. The life cycle is unknown, but the disease can be directly transmitted between oysters in a population or experimentally by cohabitation or inoculation (Elston et al. 1986, Hervio et al. 1995), suggesting that an intermediate host is not required for the parasite to complete its life cycle. Observation of free parasites in gill epithelia potentially associated with gill lesions supports the hypothesis of a parasite release through these organs (Montes et al. 1994). However, the infective form and routes of entry and release remain undetermined. Most *B. ostreae* might

*Email: iarzul@ifremer.fr

be released into the water column after oyster death through tissue lysis.

This intrahaemocytic parasite has been described in oysters collected from various ecosystems from estuaries and intertidal zones to deep coastal waters or lagoons and is presently reported in Europe, North America and Morocco. Northern European waters (e.g. Norwegian waters) seem to be free of bonamiosis, probably because of the lack of introduction of infected animals. Flat oysters from the Mediterranean Basin are infected by *Bonamia ostreae*; however, reported prevalences are low (data from REPAMO, the French network for the surveillance of mollusc diseases). No clear correlations have been demonstrated between development of the disease and environmental parameters including temperature and salinity. Previous work suggested an impact of temperature on the parasite and/or on the defence capacity of oysters. Although the disease occurs and can be transmitted throughout the year (Tigé & Grizel 1984), there is a seasonal variation in infection with *B. ostreae*. Prevalence of infection presents peaks in late winter and in autumn (Grizel 1985, Montes 1990, Van Banning 1991, Culloty & Mulcahy 1996, Arzul et al. 2006). A study of bonamiosis prevalence as well as haemocyte activities according to temperature showed that prevalence was higher at low temperature (10°C) compared to higher temperature (20°C), suggesting that low temperatures may affect defence capacities of the oyster and/or the ability of the parasite to infect healthy oysters (Cochennec & Auffret 2002).

The lack of suitable tissue culture systems and mollusc cell lines for the culture of the parasite led to the development of a purification protocol (Mialhe et al. 1988). The availability of purified *Bonamia ostreae* suspensions allowed experimental infections based on parasite injection (Hervio et al. 1995) and investigations on *in vitro* interactions between parasites and haemocytes (Chagot et al. 1992, Mourton et al. 1992). Despite possible survival of purified parasites in filtered sea water (2 wk) as assessed by the success of experimental infection (Grizel 1985), purified parasite suspensions have not yet been used to study parasite physiology or its behaviour related to environmental conditions.

In aquatic ecology, flow cytometry is classically used to determine abundance, viability and activity of microorganisms including viruses, bacteria, microalgae and planktonic protozoan parasites (Wong & Whiteley 1996, Lindström et al. 2002, Parrow & Burkholder 2002, Binet & Stauher 2006, Hammes et al. 2008). Recent developments have aimed at addressing some questions in environmental microbiology, including studying microbial physiology under environmentally relevant conditions (Czechowska et al. 2008).

Flow cytometry has been successfully used to measure cell viability of cultured *Perkinsus marinus*, a parasitic protozoan of the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Soudant et al. 2005). This tool allows multiparametric analyses on a large number of cells in a very short time and thus presents advantages over microscopic approaches.

The objectives of our study were to test survival of purified *Bonamia ostreae* in different sea water media (artificial seawater, natural seawater and seabed borewater) in order to identify the most suitable medium for parasite preservation and to investigate effects of temperature and salinity on the survival of purified parasites by flow cytometry. Purified *B. ostreae* were suspended and maintained *in vitro* in the 3 different media at 3 different temperatures and then subjected to a range of salinities in the optimal medium previously defined. Parasite mortality was measured by flow cytometry using propidium iodide staining, and parasite viability was estimated by measuring esterase activities using fluorescein diacetate (FDA). Esterases are enzymes belonging to the group of hydrolases and are classically measured to estimate global levels of viable cell activities (Gagnaire et al. 2006a, Berney et al. 2008, Rault et al. 2008). *In vitro* exposure of purified parasites to ranges of temperature and salinity may improve our knowledge of the disease epidemiology and may provide guidance for oyster farmers for stock management.

MATERIALS AND METHODS

***Bonamia ostreae* purification.** Purification of parasites was performed following the protocol of Mialhe et al. (1988) using flat oysters that originated from Quiberon Bay (France), an area infected by *B. ostreae*. Oysters were maintained for 30 d in raceways of 120 l receiving a constant flow of external seawater at a temperature of 12 to 15°C and enriched in phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis suecica*). Some highly infected *Ostrea edulis* were selected by examination of heart tissue imprints under light microscopy. Two to 3 highly infected oysters were used per purification. All organs were homogenised except the adductor muscle. Parasites were concentrated by differential centrifugation on sucrose gradients and then purified by isopycnic centrifugation on a Percoll gradient. Centrifugations were performed at 8°C. Lastly, purified parasites were resuspended in 1 ml of 0.22 µm filtered seawater before being counted using a Malassez-cell haemocytometer. Parasite suspensions were then maintained at 4°C. Salinity of filtered seawater fluctuated between 30 and 34 g l⁻¹.

Experimental design. Two sets of experiments were performed 3 times. In the first set of experiments, purified parasites were suspended in 3 different media, and 10 ml of each parasite suspension were distributed in equivalent numbers (5×10^5 cells ml^{-1}) in nine 15 ml polypropylene tubes per medium. The 3 media were (1) 0.22 μm filtered prepared artificial seawater (ASW) with a salinity of 23.4 g l^{-1} and a pH of 6.5 (23.4 g NaCl, 1.5 g KCl, 1.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_2O q.s. 1 l) (2) 0.22 μm filtered seabed borewater (SBW) showing a constant salinity of 32 g l^{-1} and a pH of 7.06 (collected at a depth of 110 m at IFREMER facilities in La Tremblade, France) (3) 0.22 μm filtered natural seawater (NSW) from La Seudre estuary, Charente Maritime (France) with a salinity of 30 to 34 g l^{-1} and a pH of 8.06. Parasites maintained in the 3 different media were subjected to 3 different temperatures: 4, 15 and 25°C (3 tubes per condition). The different parasite suspensions were tested by flow cytometry after 12, 24 and 48 h of incubation.

Regarding parasite survival according to previously tested medium and temperature, the second set of experiments, aimed at testing effects of salinity on *Bonamia ostreae* viability, was performed in SBW (stable composition compared to NSW) at 15°C (which better reflects natural conditions than does 4°C). More precisely, purified parasites were diluted in 0.22 μm filtered SBW and distributed in equivalent numbers (5×10^6 cells ml^{-1}) in 15 ml polypropylene tubes. Distilled water or natural salt from Guérande (Pays de la Loire, France) was added to obtain a range of salinities: 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45 g l^{-1} . Parasite suspensions (3 tubes per salinity condition) were incubated at 15°C , and samples were analysed by flow cytometry after 12 and 48 h.

Analysis of viability of *Bonamia ostreae* by flow cytometry. Flow cytometry protocols used in this study

were adapted from protocols previously described for *Crassostrea gigas* haemocytes (Gagnaire et al. 2006b). Each measure was carried out 3 times. For each sample, 5000 events were counted using an EPICS XL 4 (Beckman Coulter). Results were depicted under biparametric representations (density plots) showing parasite cells according to the Forward Scatter (FSc) in abscissa and Side Scatter (SSc) in ordinate and the fluorescence channel corresponding to the marker used. FSc and SSc values, which correspond to diffracted light on the acute and right angles, are proportional to cell size and cell complexity, respectively. Recorded fluorescence depended on the monitored parameters: non-specific esterase activities were measured using green fluorescence (fluorescence detector FL1), while cell mortality was measured using red fluorescence (fluorescence detector FL3).

Parasite mortality was estimated after incubating 200 μl of parasite suspensions at 5×10^5 cells ml^{-1} in the dark for 30 min at 4°C with 10 μl of the nucleic acid fluorescent dye propidium iodide (PI, 1.0 mg l^{-1} , Interchim). Non-specific esterase activities were evaluated by incubating 200 μl of parasite suspensions at 5×10^5 cells ml^{-1} in the dark for 30 min at ambient temperature with 1 μl of the liposoluble substrate fluoresceine diacetate (FDA, 400 μM in DMSO, Molecular Probes, Invitrogen).

Dead parasites, prepared by boiling cells for 15 min, were used to control efficacy of PI for mortality measurement. The FL3 fluorescence histogram showed that 98.1% of PI-stained cells (red fluorescence above 1) were dead (Fig. 1a). Suspension of live parasites was used to control efficacy of FDA for esterase activity measurement (Fig. 1b). The FL1 fluorescence histogram showed that 91% of fluorescent cells after incubation with FDA (green fluorescence above 1) were alive and presented esterase activity (Fig. 1b).

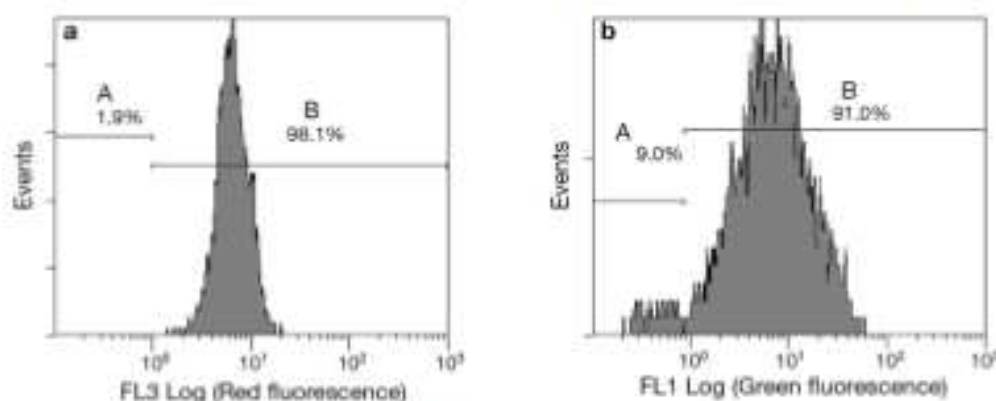


Fig. 1. *Bonamia ostreae*: (a) Red fluorescence of parasites after boiling and staining with propidium iodide. Bracket A corresponds to non-stained cells (= live cells) and Bracket B corresponds to stained cells (= dead cells); (b) Green fluorescence of parasites just after purification, in the presence of fluoresceine diacetate. Bracket A corresponds to non-fluorescent cells (= non-active cells) and Bracket B corresponds to fluorescent cells (= active cells)

Statistical analysis. Data were analysed using the software Statgraphics® Plus version 5.1. Results were expressed as percentages of positive cells. Mean and SD were calculated for each triplicate. The effect of tested conditions was evaluated by 1-way, 2-way and 3-way analyses of variance (ANOVAs). Values were converted into r angular arcsinus $\sqrt{(\% \text{ of positive cells})}$ before analysis to ensure respect of *a priori* assumptions of normality and homogeneity. In the case of rejection of H_0 , an *a posteriori* least significant difference test was used to compare differences between means and to obtain hierarchy between studied factors. Significance was concluded at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Size and complexity of parasites

Size and to a lesser degree complexity of parasites varied according to whether they were dead or alive. Irrespective of the tested conditions, it was possible to identify 2 populations of parasite cells (Fig. 2a): population A, comprising $53 \pm 24\%$ of live cells and population B, smaller in size and consisting of a majority of dead cells (mean $74 \pm 23\%$). Some parasite cells were not included in population A or B and corresponded generally to dead cells showing higher size and higher complexity than cells included in populations A and B. For parasites maintained in NSW at 4°C 12 h after purification, populations A and B included 75.8% and 15.7% of total cells, respectively (Fig. 2a). When only considering non-PI-stained parasites under the same experimental conditions, populations A and B included 91% and 6.5% of live cells, respectively (Fig. 2b). After boiling, when only considering PI-stained cells, populations A and B included 8.6% and 88% of dead cells, respectively (Fig. 2c). Population A included more live cells ($77.6 \pm 6.2\%$) when mortality rates were below 50% compared to mortality rates above 70% ($37.3 \pm 24.7\%$; Table 1). In contrast, population B included more dead cells when mortality rates were high ($91.7 \pm 7.4\%$ for mortality rates above 70%; Table 1).

Effect of medium on cell viability

In the 3 experiments simultaneously testing the effect of medium, temperature and incubation time on parasites (3-way ANOVA), medium was the most important factor in parasite survival ($p = 0$) and influenced cell mortality and esterase activity more than did temperature and incubation time (Table 2). Irrespective of incubation time and temperature, parasites

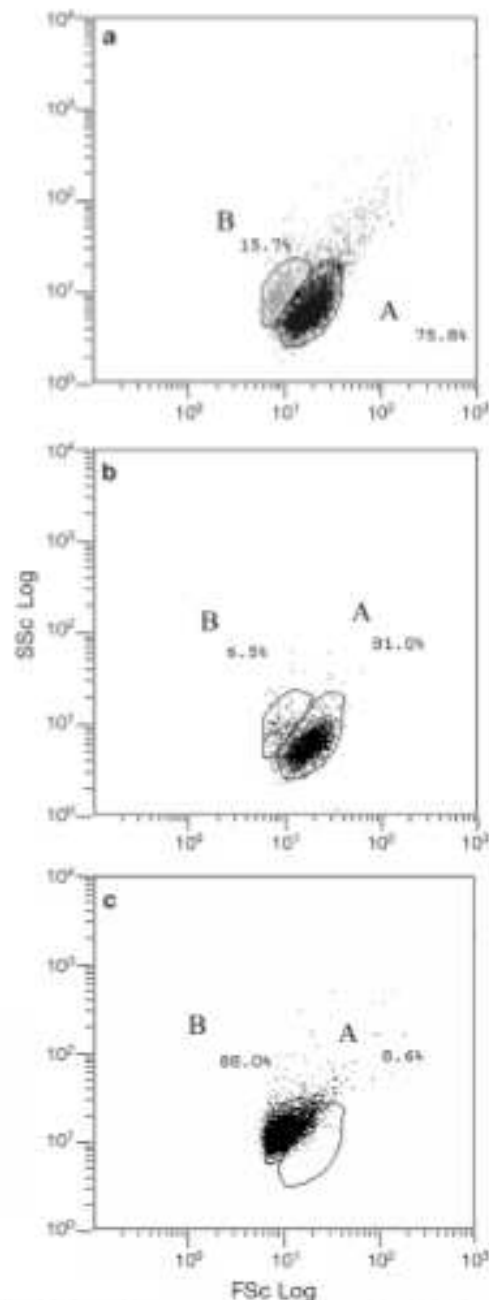


Fig. 2. *Bonamia ostreae*. (a) Parasites maintained in natural seawater at 4°C 12 h after purification. This cytogram shows both propidium iodide (PI)-stained and non-stained cells. Population A: 75.8% of total cells; population B: 15.7% of total cells. (b) Parasites maintained in natural seawater at 4°C 12 h after purification. This cytogram only shows non-PI-stained cells. Populations A and B include 91% and 6.5% of live cells, respectively. (c) Parasites after boiling. This cytogram only shows PI-stained cells. Populations A and B include 8.6% and 88% of dead cells, respectively. FSc/SSc: forward/side scatter, respectively.

Table 1. *Bonamia ostreae*. Distribution of cells in percentages (means \pm SD) belonging to populations A and B (as shown in Fig. 2; see text for details) and composition of live and dead cells in these 2 populations according to the parasite mortality rate

| Mortality rate | Population A | Population A live | Population B | Population B dead |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <50% | 56.68 (\pm 18.11) | 77.58 (\pm 6.21) | 15.66 (\pm 5.16) | 53.54 (\pm 22.03) |
| \geq 50% and <70% | 50.29 (\pm 20.78) | 56.35 (\pm 8.16) | 22.74 (\pm 10.65) | 74.99 (\pm 13.79) |
| \geq 70% | 25.64 (\pm 17.06) | 37.33 (\pm 24.56) | 49.51 (\pm 14.44) | 91.67 (\pm 7.43) |

Table 2. ANOVAs comparing the percentages of mortality and the percentages of cells positive for esterase activity according to medium, temperature (Temp) and incubation time (Time). NSW: natural seawater, SBW: seabed borewater, ASW: artificial seawater. Terms significant at $p < 0.05$ are highlighted in **bold** and compared using a least significant difference (LSD) test

| | df | Cell mortality | | Esterase activity | |
|-----------|----|--|--------------|--|--------------|
| | | F | p | F | p |
| Time | 2 | 0.47 | 0.630 | 6.35 | 0.003 |
| Medium | 2 | 31.68 | 0.000 | 8.96 | 0.000 |
| Temp | 2 | 6.81 | 0.002 | 5.10 | 0.009 |
| LSD tests | | Medium ASW > NSW = SBW Temp 4°C > 15°C > 25°C | | Medium ASW < NSW = SBW Temp 4°C > 15°C > 25°C Time 12 h > 24 h = 48 h | |

showed significantly better survival in NSW and SBW than in ASW (Fig. 3, Table 2). However, there was no significant difference between mortality and esterase activity percentages in NSW and SBW. Mean parasite mortality was 29.1%, 31.4% and 71.1% in NSW, SBW and ASW, respectively. The percentage of parasites positive for esterase activity was $44.9 \pm 7.8\%$ in NSW, $48.2 \pm 6.5\%$ in SBW and $30.6 \pm 4.1\%$ in ASW.

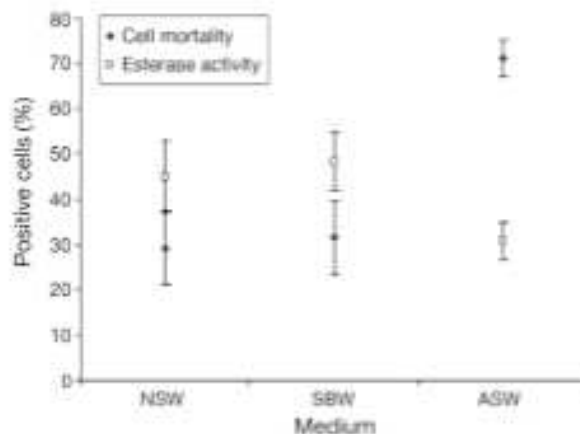


Fig. 3. *Bonamia ostreae*. General means and SE of cell mortality and esterase activity per medium (time and temperature data pooled); $n = 27$ replicates. NSW: natural seawater; SBW: seabed borewater; ASW: artificial seawater

Effect of temperature on cell viability

Parasite viability fluctuated according to the tested temperature. Irrespective of medium and incubation time, mortality appeared significantly higher at 25°C compared to 15°C and 4°C, and percentages of cells presenting esterase activity were higher at 4°C compared to 15°C and 25°C (3-way ANOVA, Table 2). In NSW, irrespective of incubation time, mortality percentages ranged from 11.92 to 25.59% at 4°C, from 16.2 to 31.83% at 15°C and from 39.26 to 75.55 at 25°C (Fig. 4). Cell mortality was thus higher at 25°C compared to 4°C and 15°C, especially after 24 and 48 h of incubation ($p < 0.0001$; Fig. 4). In SBW, irrespective of incubation time, the percentage of parasites positive for esterase activity ranged from 52.49 to 73.67% at 4°C, from 31.27 to 43.73% at 15°C and from 21.89 to 53.28% at 25°C (Fig. 5).

Effect of incubation time on cell viability

Irrespective of medium and temperature, incubation time did not have a significant effect on parasite mortality. However, a difference in the percentages of cells presenting esterase activity was noted between 12 and 24 h of incubation ($p = 0.003$; 3-way ANOVA, Table 2). In NSW and SBW, parasite survival and parasites presenting esterase activity were higher at 4°C and 15°C than at 25°C, especially after 48 h of incubation [Figs. 4

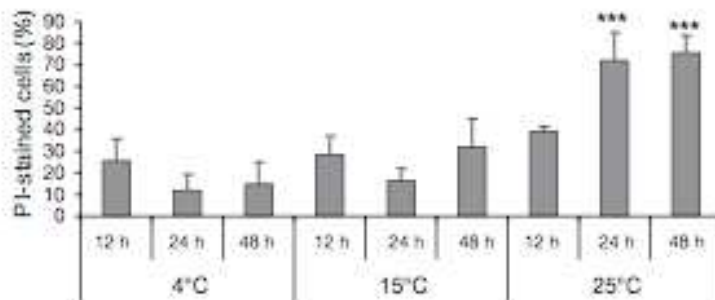


Fig. 4. *Bonamia ostreae*. Mortality (percentages of propidium iodide [PI]-stained cells) in natural seawater according to the temperature and incubation time (values are means + SE of 3 replicates). *** $p < 0.0001$ compared to data at 25°C 12 h after incubation and compared to data at 4°C and 15°C

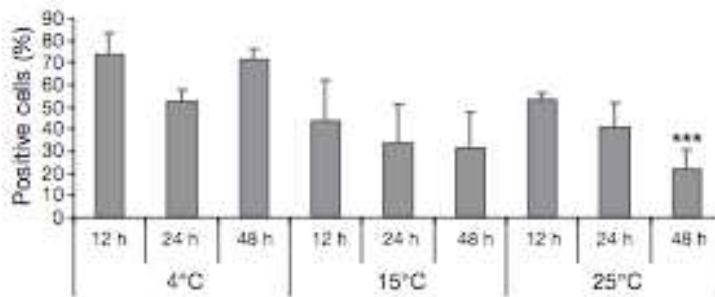


Fig. 5. *Bonamia ostreae*. Esterase activity (percentages of positive cells) in seabed borewater according to the temperature and incubation time (values are means + SE of 3 replicates). *** $p = 0.0004$ compared to data at 25°C 24 h after incubation

& 5). In NSW, after 48 h of incubation, mean parasite mortality was 75.55%, 31.83% and 14.73% at 25°C, 15°C and 4°C, respectively (Fig. 4). At 25°C, mortality was significantly higher after 24 and 48 h of incubation compared to 12 h ($p < 0.0001$). Similarly, the percentage of parasites presenting esterase activity significantly decreased at 25°C after 48 h of incubation. In

SBW at 25°C, the percentage of positive cells was $47.23 \pm 13.31\%$ after 24 h and $23.54 \pm 8.65\%$ after 48 h ($p = 0.0004$, Fig. 5).

Effect of salinity on cell viability

Incubation length had no significant effect on cell mortality (2-way ANOVA: $F_1 = 1.81$, $p = 0.186$). Therefore, data obtained on independent samples after 12 and 48 h of incubation were pooled. A *posteriori* tests showed that salinities of 5, 15 and 20 $g\ l^{-1}$ were associated with the highest mortality, whereas salinities of 35, 40 and 45 $g\ l^{-1}$ allowed better parasite survival (Fig. 6). Higher percentages of cells positive for esterase activity were found at higher salinities (35 to 45 $g\ l^{-1}$; Fig. 7). Moreover, incubation time had a significant effect on parasite esterase activity (2-way ANOVA, $F = 15.3$, $p = 0$). There was a significant decrease in the percentage of positive parasites between 12 and 48 h irrespective of tested salinities except at 25 $g\ l^{-1}$ (Fig. 7).

DISCUSSION

Despite 25 yr of research on the protozoan *Bonamia ostreae*, its life cycle is poorly known. Regardless of the date at which naïve oysters are placed in an infected area, the first known stages of the parasite are observed 3 to 5 mo after exposure to the parasite (Tigé & Grizel 1984, Montes 1991). Moreover, the infection seems to remain present in areas that have been cleaned and that have ceased to produce

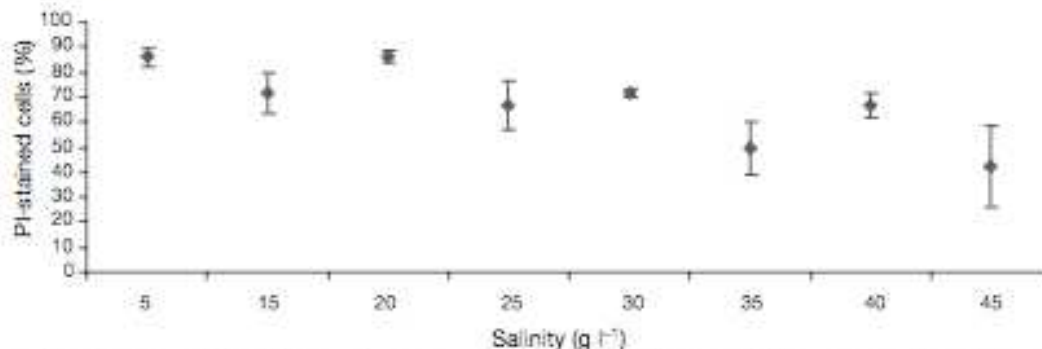


Fig. 6. *Bonamia ostreae*. Mortality (percentages of propidium iodide [PI]-stained cells) according to the salinity of seabed borewater (all time data were pooled). Values are means \pm SE, N = 6 replicates

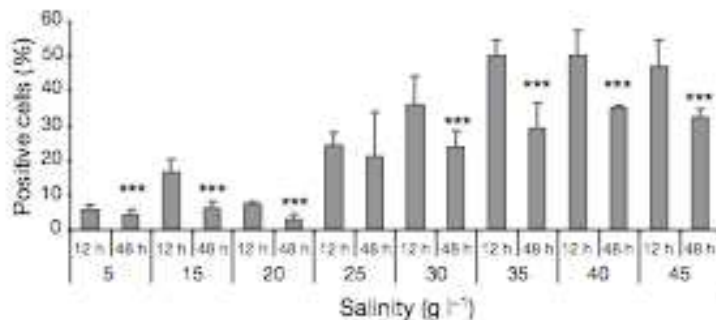


Fig. 7. *Bonamia ostreae*. Esterase activity (percentages of positive cells) in seabed borewater according to the salinity and incubation time (values are means of 3 replicates; bars represent SE). *** $p < 0.001$ compared to data 12 h after incubation.

oysters for several years (Van Banning 1988). The lag-time before infection and persistence of the disease in cleaned areas have motivated some authors to investigate potential involvement of macroinvertebrate and zooplankton species in the *B. ostreae* life cycle (Lynch et al. 2007). Nevertheless, considering the correlation between density of oysters and prevalence of bonamiosis (Grizel 1985, Hudson & Hill 1991), the parasite mainly depends on flat oysters *Ostrea edulis* for its survival and spread, and other aquatic organisms might not be involved as important carriers or transmitters (Van Banning 1988). Transmission of *B. ostreae* between oysters probably occurs through the water column. Water characteristics can affect the survival of the parasites released outside the host, and these characteristics can influence the infective capacity of *B. ostreae* as well as the number of oysters newly infected.

In that context, the effects of 2 environmental parameters, salinity and temperature, on parasite viability were investigated at different incubation times: 12, 24 and 48 h. Trials were stopped at 48 h because some preliminary results were not reproducible beyond this incubation time. In addition, the suitability of 3 different seawater media for parasite preservation was tested: 0.22 μm filtered NSW; 0.22 μm filtered SBW (with a constant composition) and 0.22 μm filtered ASW (which is easy to acquire and has a constant composition).

Size and complexity of *Bonamia ostreae* were generally homogeneous but depended on the status of the parasite cells, i.e. whether they were live or dead. Two populations were distinguished: a homogeneous population of small parasites corresponding mainly to dead cells and increasing proportionally to recorded mortality, and another population that was less homogeneous and larger in size increasing proportionally to survival rates. These results suggest that when dying, *B.*

ostreae become smaller. Such a phenomenon has been described in apoptotic cells (Cotter et al. 1992, Samali & Cotter 1999, Nasirudeen et al. 2001).

Results showed a better survival of purified *Bonamia ostreae* (60 to 80%) in filtered NSW and in filtered SBW than in filtered ASW (less than 40%) regardless of temperature and incubation time. This result could be explained by a difference in pH. Indeed, pH of ASW used in this study was more acid (6.5) than NSW (8.06) and SBW (7.06). The effect of pH on parasite viability was not investigated in the present study. Moreover, a difference in salinity was also noticed between tested media: between 30 and 34 g l^{-1} for NSW, 32 g l^{-1} for SBW and 23.4 g l^{-1} for ASW. Therefore, in addition to being more acidic, ASW had a lower salinity than the other tested media, which could explain the poor survival of parasites.

Although no significant differences in mortality and non-specific esterase activity were observed between parasites maintained at 4°C and 15°C in NSW or SBW, 25°C did not appear suitable for parasite survival. Under natural conditions, the disease is reported in areas where seawater temperature rarely reaches 25°C except in the Mediterranean Sea, where *Bonamia ostreae* has been reported but with low prevalence ($0.9 \pm 1.4\%$, data from REPAMO, the French network for the surveillance of mollusc diseases). In Quiberon Bay (Morbihan, France) where the prevalence of bonamiosis has been estimated at $12.4\% \pm 6.5$ (data from REPAMO), summer water temperatures fluctuated between 16.9 and 19.6°C between 1989 and 2003, with a mean estimated at 18.5°C (data from REPHY, the French network for the surveillance of phytoplankton and phycotoxins). Some analyses revealed a negative correlation between high summer water temperature and number of infected oysters detected during the following winter (I. Arzul unpubl. data), suggesting that higher temperatures do not favour infection of oysters. A study on *Crassostrea gigas* haemocytes showed that an increase in temperature and a decrease in salinity induced an increase in cell mortality (Gagnaire et al. 2006a), suggesting that these environmental parameters also have an effect on oyster defence capacities. Similarly, previous work has demonstrated an effect of temperature on flat oyster *Ostrea edulis* defence mechanisms (Cochennec & Aulfret 2002); lower temperatures were associated with increased prevalence of bonamiosis. However in the same study, haemocyte activities were tested by flow cytometry and revealed that low temperature (10°C) or a decrease in temperature (from 20°C to 10°C) induced

a decrease in enzymatic activity, including production of reactive oxygen species involved in defence mechanisms. Several authors described a seasonal variation of infection with *B. ostreae*, i.e. the prevalence of infection presenting peaks in late winter and in autumn, which suggests an involvement of environmental parameters including temperature in the development of the disease (Grizel 1985, Montes 1990, Van Banning 1991, Culloty & Mulcahy 1996). Studies on *Bonamia* sp. infecting the Asian oyster *C. ariakensis* in Atlantic coastal waters of the US showed a strong influence of temperature on seasonal parasite cycling (Carnegie et al. 2008). Interestingly, when these oysters were placed in infected areas, temperatures around 25°C were associated with higher prevalence than temperatures below 20°C. Experimental studies support these results, showing that warm temperatures (>20°C) seem to increase *Bonamia* sp. pathogenicity (Audemard et al. 2008a). Epidemiological data available for *Bonamia* (= *Mikrocytos*) *roughleyi* show that the disease expressed during winter oyster mortalities is associated with low temperatures (Wolf 1967). However, these studies considered the parasite inside its host and thus investigated the effects of temperature on host–parasite relationships and not directly on parasite survival.

Purified *Bonamia ostreae* seem to show a preference for hypersaline media compared to hyposaline media. Three ranges of salinities could be identified from our results: from 5 to 20 g l⁻¹, survival and esterase activity measures were very low, although a mean of 10% of live cells could still be detected, suggesting that the parasite can still be transmitted under these conditions; between 25 and 30 g l⁻¹, survival was intermediate (estimated at 35% after 12 h of incubation); between 35 and 45 g l⁻¹, survival was higher and estimated at 50% after 12 h of incubation.

As previously mentioned, measures of parasite survival in the 3 tested media (NSW, SBW and ASW) supported these results. Indeed, parasite mortality was higher in ASW (salinity of 23.4 g l⁻¹) compared to NSW (salinity of 32 to 34 g l⁻¹) and SBW (salinity of 32 g l⁻¹).

These results are also concordant with a previous study on *Bonamia exitiosa* in New Zealand, in which a salinity of 40 g l⁻¹ was associated with the highest disease prevalences (Hine 2002). Similarly, infection with *B. roughleyi* seems to be favoured by high salinities (30 to 35 g l⁻¹) (Farley et al. 1988). Our results are also in concordance with data obtained during a recent study in which salinity below 30 g l⁻¹ was associated with lower host mortality and appeared detrimental to *Bonamia* sp. in *Crassostrea ariakensis* (Audemard et al. 2008b).

Incubation time showed an effect on parasite survival, especially by increasing the effect of high tem-

peratures on mortality (higher mortality) and esterase activity (lower percentages of positive cells). Moreover, regardless of the tested salinity, percentages of cells producing esterase activity were lower after 48 h compared to 12 h. It would be interesting to strengthen these results by testing a wider range of incubation times in order to evaluate the persistence capacity of *Bonamia ostreae* in NSW collected from different infected areas. However, mortality and esterase activity measured by flow cytometry are instantaneous and do not allow us to follow cumulative mortality.

In the present context of global climate change, data allowing forecasting of disease evolution are needed. Oysters are subject to environmental change in addition to parasites. Our description of the influence of temperature and salinity on *Bonamia ostreae* viability should allow us to model parasite transmission. Moreover, our results will contribute to defining risky and non-risky geographic areas with regard to disease transmission. These data might also be of interest to oyster farmers. Indeed, by monitoring temperature and salinity parameters, oysters might be moved or sold before suitable conditions for parasite survival are reached.

Acknowledgements. We thank R. Brizard and his team for technical assistance in the maintenance of oysters in raceways in IFREMER La Tremblade quarantine. A. Langlade is also acknowledged for supplying flat oysters from Quiberon Bay, France.

LITERATURE CITED

- Arzul I, Miossec L, Blanchet E, Garcia C, François C, Joly JP (2006) *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis*: a stable host-parasite system in France? Proc 11th ISVEE Conference, Cairns
- Audemard C, Carnegie RB, Bishop M, Peterson CH, Burreson E (2008a) Interacting effects of temperature and salinity on *Bonamia* sp. parasitism in the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *J Invertebr Pathol* 98:344–356
- Audemard C, Carnegie RB, Stokes NA, Bishop M, Peterson CH, Burreson E (2008b) Effects of salinity on *Bonamia* sp. survival in the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *J Shellfish Res* 27:535–540
- Berney M, Vital M, Hübshoff I, Weilenmann HU, Egli T, Hammes F (2008) Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Res* 42:4010–4018
- Sinet MT, Stauber JL (2006) Rapid flow cytometric method for the assessment of toxic flagellate cyst viability. *Mar Environ Res* 62:247–260
- Carnegie RB, Stokes NA, Audemard C, Bishop M and others (2008) Strong seasonality of *Bonamia* sp. infection and induced *Crassostrea ariakensis* mortality in Bogue and Masonboro Sounds, North Carolina, USA. *J Invertebr Pathol* 98:335–343
- Chapot D, Boulo V, Hervio D, Mialhe E, Bachere E, Mourton C, Grizel H (1992) Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascomospora) and hemocytes of *Ostrea edulis*

- and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): entry mechanisms. *J Invertebr Pathol* 59:241-249
- Cochenneq N, Auffret M (2002) European project DISENY PA1R984120 'Environmental Factors and Shellfish Diseases' 15/05/2002 Final Report. Project details available at: <http://cordis.europa.eu/>
- Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM, Green DR (1992) Microfilament-disrupting agents prevent formation of apoptotic bodies in tumour cells undergoing apoptosis. *Cancer Res* 52:997-1005
- Culloty SC, Mulcahy MF (1996) Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the South coast of Ireland. *Aquaculture* 144:53-63
- Czechowska K, Johnson DR, Roelof van der Meer J (2008) Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Curr Opin Microbiol* 11:205-212
- Elston RA, Farley CA, Kent ML (1986) Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis Aquat Org* 2:49-54
- Farley CA, Wolf PH, Elston RA (1988) A long-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytes* (g.n.) and two new species *Mikrocytes mackini* (sp.n.) and *Mikrocytes roughleyi* (sp.n.). *Fish Bull* (Wash DC) 86:581-593
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renault T (2006a) Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol* 20:536-547
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T (2006b) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* 22:1-14
- Grizel H (1985) Etudes des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'aquaculture bretonne. PhD dissertation, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier
- Hammes F, Berney M, Wang Y, Vital M, Köster O, Egli T (2008) Flow cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res* 42:269-277
- Hervio D, Béchère E, Boule V, Cochenneq N and others (1995) Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocyte protozoan parasite *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oyster. *Aquaculture* 132:183-194
- Hine PM (2002) Severe epizootic infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a possible predisposing factor in bonamiasis. *Dis Aquat Org* 51:49-60
- Hudson EB, Hill BJ (1991) Impact and spread of bonamiasis in the UK. *Aquaculture* 93:279-285
- Lindström ES, Weisse T, Stadler P (2002) Enumeration of small ciliates in culture by flow cytometry and nucleic acid staining. *J Microbiol Methods* 49:173-182
- Lynch SA, Armitage DV, Wyde S, Mulcahy MF, Culloty SC (2005) The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *J Shellfish Res* 24:1919-1925
- Lynch SA, Armitage DV, Coughlan J, Mulcahy MF, Culloty SC (2007) Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Exp Parasitol* 115:359-368
- Mialhe E, Béchère E, Chagot D, Grizel H (1988) Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 71:293-299
- Montes J (1990) Development of *Bonamia ostreae* parasitism of flat oyster, *Ostrea edulis*, from Galicia, northwest Spain. In: Perkins FO, Cheng TC (eds) Pathology in marine aquaculture. Academic Press, New York, p 223-227
- Montes J (1991) Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 93:235-239
- Montes J, Anadón R, Azevedo C (1994) A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J Invertebr Pathol* 63:1-6
- Mourton C, Boule V, Chagot D, Hervio D, Béchère E, Mialhe E, Grizel H (1992) Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asnetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): in vitro system establishment. *J Invertebr Pathol* 59:235-240
- Nasiradeen AMA, Tan KSW, Singh M, Yap EH (2001) Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blasotrysis hominis*. *Parasitology* 123:235-245
- Parrow MW, Burkholder JM (2002) Flow cytometric determination of zoospore DNA content and population DNA distribution in cultured *Pfiesteria* spp. (Pyrrophyta). *J Exp Mar Biol Ecol* 267:35-51
- Rault A, Boutx M, Béal C (2008) Dynamic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 physiological characteristics during fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:559-570
- Samali A, Cotter TG (1999) Measurement of cell death in culture. In: Jenkins N (ed) Animal cell biotechnology: methods and protocols. Series: methods in biotechnology, Vol B. Humana Press, Totowa, NJ, p 155-164
- Soudant P, Chu PLE, Lund ED (2005) Assessment of the cell viability of cultured *Perkinsus marinus* (Perkinsea), a parasitic protozoan of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using SYBRgreen-Propidium iodide double staining and flow cytometry. *J Eukaryot Microbiol* 52:492-499
- Sprague V (1979) Classification of the Haplosporidia. *Mar Fish Rev* 41:40-44
- Tigé G, Grizel H (1984) Essai de contamination d'*Ostrea edulis* Linne par *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1979) en rivière de Crach (Morbihan). *Rev Trav Inst Pêch Marit* 45:307-314
- Van Banning P (1988) Management strategies to control diseases in the Dutch culture of edible oysters. In: Fisher WS (ed) Disease processes in marine bivalve molluscs. Am Fish Soc Spec Publ 18:243-245
- Van Banning P (1991) Observations on bonamiasis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 93:205-211
- Wolf P (1967) Winter mortality hits state's oyster output. *Fisherman* 2:20-22
- Wong JTY, Whiteley A (1996) An improved method of cell cycle synchronisation for the heterotrophic dinoflagellate *Cryptothecodinium coballii* Biecheler analyzed by flow cytometry. *J Exp Mar Biol Ecol* 197:91-99

Editorial responsibility: Miko Hine,
Fouras, France

Submitted: October 29, 2008; Accepted: February 17, 2009
Proofs received from author(s): April 10, 2009

Annexe 2

Bonamia ostreae-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge

Delphine Lallias, Isabelle Arzul, Serge Heurtebise, Sylvie Ferrand, Bruno Chollet, Maeva Robert, Andy R. Beaumont, Pierre Boudry, Benjamin Morga and Sylvie Lapègue Aquat. Living Resour. 21, 423–439 (2008)

Bonamia ostreae-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge

Delphine Lallias^{1,2,a}, Isabelle Arzul¹, Serge Heurtebise¹, Sylvie Ferrand¹, Bruno Chollet¹, Maeva Robert¹, Andy R. Beaumont², Pierre Boudry^{1,b}, Benjamin Morga¹ and Sylvie Lapègue¹

¹ IFREMER, Laboratoire Génétique et Pathologie, Rance-les-bains, 17390 La Tremblade, France

² School of Ocean Sciences, College of Natural Sciences, Bangor University, Menai Bridge, Anglesey, LL59 5AB, UK

Received 3 April 2008; Accepted 10 July 2008

Abstract – Bonamiosis is a parasitic disease (causative agent: *Bonamia ostreae*) affecting the European flat oyster *Ostrea edulis*, responsible for a drastic decline in its aquaculture production. Selective breeding programs for resistance to bonamiosis have been undertaken to counter this disease. In the present study, a 6-month cohabitation challenge experiment was performed in order to transmit the disease from wild oysters injected with the parasite to two tested families of oysters (20 and 8-month old at the beginning of the experiment, with different genetic backgrounds) originating from a selective breeding program developed by IFREMER in France. Mortalities were checked daily and ventricular heart smears were performed on dying or moribund oysters to detect the level of infection by *B. ostreae*. Mortality started after 4 months of cohabitation in the tested oysters. The cumulative mortalities after 6 months were 58% for the wild oysters, 9% for Family 1 (20-month old) and 20% for Family 2 (8-month old). In the dying oysters, the parasite could be detected in 67% of the wild oysters, 68% of Family 1 and 89% of Family 2. It was detected in only 11% of the surviving oysters of Family 2. The mortality and the level of infection by the parasite were significantly higher in Family 2 than in Family 1. Our results demonstrate that pre-spawning oysters as young as 1 year-old can become infected with the parasite and, most importantly, can die from bonamiosis. This result is inconsistent with the commonly accepted critical age of 2 years-old for the disease development. Additionally, no clear relationship between shell length and level of infection was observed. We also review the different methods for infection of the European flat oyster *O. edulis* with *B. ostreae* under experimental conditions and their main results.

Key words: *Ostrea edulis* / *Bonamia ostreae* / Cohabitation experiment / Transmission / Heart smear

Résumé – Mortalités induites par *Bonamia ostreae* chez des huîtres plates européennes *Ostrea edulis* âgées d'un an : infection expérimentale par cohabitation. La bonamiose est une maladie parasitaire (agent causal : *Bonamia ostreae*) affectant l'huître plate européenne *Ostrea edulis*, responsable d'un déclin drastique de sa production aquacole. Des programmes de sélection pour la résistance à la bonamiose ont été entrepris pour contrer cette maladie. Dans cette étude, une expérience de 6 mois d'infection par cohabitation a été réalisée de manière à transmettre la maladie à partir d'huîtres sauvages injectées avec le parasite vers deux familles testées d'huîtres (âgées de 20 et 8 mois en début d'expérience, avec des origines génétiques différentes) issues du programme de sélection développé par IFREMER en France. Les mortalités ont été vérifiées quotidiennement et des frottis de cœur ventriculaire réalisés sur les huîtres mortes ou moribondes pour détecter le niveau d'infection par *B. ostreae*. La mortalité a commencé chez les huîtres testées après 4 mois de cohabitation. Les mortalités cumulées après 6 mois étaient de 58 % chez les huîtres sauvages, 9 % chez la Famille 1 (âgées de 20 mois) et 20 % chez la Famille 2 (âgées de 8 mois). Chez les huîtres mourantes, le parasite a pu être détecté chez 67 % des huîtres sauvages, 68 % de la Famille 1 et 89 % de la Famille 2. Il n'a pu être détecté que chez 11 % des huîtres survivantes de la Famille 2. La mortalité et le niveau d'infection par le parasite étaient significativement plus élevés chez la Famille 2 que chez la Famille 1. Nos résultats démontrent que des huîtres âgées de un an peuvent devenir infectées par le parasite et surtout, peuvent mourir de bonamiose. Ce résultat

contraste avec l'âge critique de développement de la maladie communément accepté de 2 ans. De plus, aucune relation claire entre la longueur de la coquille et le niveau d'infection n'a été observée. Nous faisons également la revue des différentes méthodes d'infection de l'huître plate européenne *O. edulis* avec *B. ostreae* en conditions expérimentales et leurs principaux résultats.

1 Introduction

The European flat oyster *Ostrea edulis* is a species endemic to European and North African coasts and can be found from Norway to Morocco as well as in the whole Mediterranean Basin (Jaziri 1985). It is a sequential protandrous hermaphroditic oyster which can change sex within one breeding season, being asynchronously male or female although selfing has been recorded under experimental conditions (Lallias 2007) and which broods eggs and early larvae in the mantle cavity of the female (Yonge 1960; Le Dantec and Marteil 1976).

Following overexploitation of European oyster populations during the 19th century, massive mortalities occurred in France in the 1920's. Some populations later recovered but many were replaced by the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* that had been introduced accidentally into France in the 1860's and later by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in 1970's (Comps and Duthoit 1976). Over the last forty years, European production of *O. edulis* has shown a drastic decline from a peak output of nearly 30 000 tons in 1961, mainly due to the rapid spread and strong impact of two parasitic diseases, due to *Marteilia refringens* and *Bonamia ostreae*. In 2006, 61% of the production was in Spain (3200 tons) and 19% in France (1000 tons) (FAO 2007).

Bonamiosis is an intrahaemocytic parasitosis caused by the protozoans *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa*. The parasite *B. ostreae* was first described in Brittany (France) by Pichot et al. (1979) and Comps et al. (1980). It is an intracellular parasite (2–5 µm) that infects haemocytes and exhibits two distinct cellular types, either dense or clear cells. Its inclusion into the phylum Haplosporidia has recently been confirmed (Carnegie et al. 2000; Cochenneec et al. 2000). This disease was later reported in the Netherlands (Van Banning 1985, 1991), Denmark (Elston et al. 1987), Spain (Montes and Melendez 1987; Figueras 1991), England (Bucke et al. 1984), Ireland (McArdle et al. 1991) and North America (Elston et al. 1986; Friedman et al. 1989; Barber and Davis 1994; Friedman and Perkins 1994). The disease has been correlated with haemocyte destruction and haemocytic infiltration of the connective tissue of the gills, mantle and digestive gland due to the proliferation of *B. ostreae* (Balouet et al. 1983; Cochenneec-Laureau et al. 2003). The first mortalities are generally observed when the oysters reach two-years old (Culloty and Mulcahy 1996) although younger individuals (0+ and 1+) have been shown to be susceptible to the infection (Lynch et al. 2005). Some studies reported a seasonal pattern of prevalence and mortality, with highest levels occurring in autumn-winter (Grizel 1985; Montes 1990; Van Banning 1991; Culloty and Mulcahy 1996).

Numerous studies have aimed to clarify the mode of transmission and dynamics of the disease (see Annexes 1 to 4). Most of them were based on field testing, deploying naïve oysters (i.e. never exposed to the parasite) in a contaminated area, recording the time to the first infections and their evolution

over time (Poder et al. 1982; Tigé and Grizel 1984; Montes 1991; Martin et al. 1993; Cáceres-Martínez et al. 1995; Culloty and Mulcahy 1996; Naciri-Graven et al. 1998; Culloty et al. 1999; Montes et al. 2003; Culloty et al. 2004; Lynch et al. 2005). Other studies were based on experimental cohabitation between oysters sampled in contaminated areas and naïve oysters, in order to analyze the evolution of the disease (Elston et al. 1986, 1987; Martin et al. 1993; Culloty et al. 1999). The development of a protocol to purify *B. ostreae* from infected oysters (Mialhe et al. 1988) enabled experimental infections by injecting the parasite into flat oysters (Mialhe et al. 1988; Martin et al. 1993; Hervio et al. 1995; Culloty et al. 1999) or by the cohabitation between source oysters injected with a known number of cells of *B. ostreae* and naïve oysters (Culloty et al. 1999). Finally, several studies focused on the role of intermediate hosts or vectors in the transmission of the disease, in particular the role of the macrofauna (Culloty et al. 1999; Lynch et al. 2007).

Despite new management practices (e.g. reducing stocking densities under suspension culture or selling oysters at a lower weight before significant *B. ostreae*-induced mortalities occur), the production of *O. edulis* in Europe has remained low due to bonamiosis. Selective breeding programs were initiated in Ireland and France, with the main objective of producing flat oysters tolerant to bonamiosis (Culloty et al. 2004; Lapègue et al. 2004). In France, this was first initiated in 1985 by IFREMER, producing two oyster strains (S85 and S89) by mass spawning (Naciri-Graven et al. 1998). Individual selection was applied through inoculation tests and field testing, the surviving oysters being used to produce the next generation. Three generations of selection were carried out for S85 and two for S89. At that stage, microsatellite analyses showed that these strains exhibited a low genetic diversity due to population bottlenecks, leading to small effective population sizes and subsequent inbreeding (Launey et al. 2001). As a result, the second stage of this selective breeding program consisted of the production of bi-parental families combined with within-family selection. Families produced in 1995 consisted of within-strain crosses. Then, in order to maximize genetic variability, families produced in 1998 were issued from among-strain crosses between S85 and S89 (Launey 1998). These families showed enhanced survival and lower prevalence of the parasite compared with control wild-type oysters in *B. ostreae*-contaminated areas (Lapègue et al. 2004).

The aim of the present study was to undertake a challenge experiment by cohabitation in order to transmit the disease from wild oysters (injected with the parasite) to two families of oysters originating from the IFREMER selective breeding program and to follow the dynamics of mortality in association with the detection of *B. ostreae*. We also review the different methods for infection of the European flat oyster *O. edulis* with *B. ostreae* under experimental conditions and their main results.

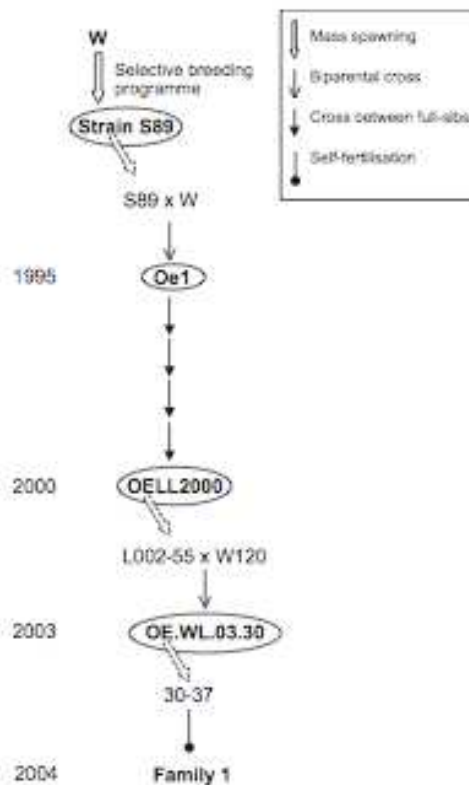


Fig. 1. Production of the experimental Family 1. W: wild oysters; S: selected strain; L: inbred line. OELL2000 is an inbred line of 4th generation.

2 Materials and methods

2.1 Wild oysters

Wild oysters weighing 45–50 g ($n = 462$) were collected in January 2006 from Quiberon Bay (Brittany, France), a bonamiosis-infected zone since 1980. Prevalence reported in Quiberon Bay in October 2005 was estimated to be 4% (data from REPAMO, French network for the surveillance of mollusc diseases).

2.2 Biparental families

Because flat oysters are alternating hermaphrodites and females brood their larvae in their mantle cavity, it was not possible to determine in advance the sex of the oysters or to strip spawn the gonads for collecting gametes. Therefore, all biparental crosses were achieved by putting pairs of oysters in 2l aquaria, each aquarium being individually supplied with filtered sea water. The outlet water pipe of each aquarium was placed above a 100 μm -mesh sieve for the collection of larvae. Sieves were checked daily for the presence of larvae and larvae and spat were cultured following a protocol based on that originally described by Walne (1974).

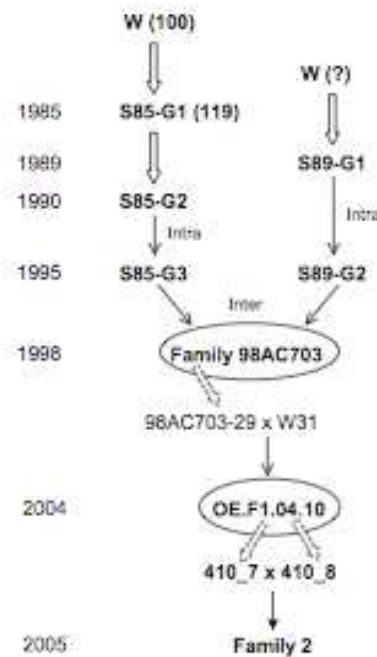


Fig. 2. Production of the experimental Family 2. W: wild oysters. In bracket is stated the number of progenitors used to produce the next generation by mass spawning ? : unknown number of progenitors. S85-G1, S85-G2 and S85-G3 represent the three generations of selection of the selected strain S85. S89-G1 and S89-G2 represent the two generations of selection of the selected strain S89. Intra: intra-strain biparental crosses; Inter: inter-strain biparental crosses.

The first experimental family, Family 1 (Fig. 1), was initiated in 2003 by crossing a wild-type oyster and an oyster from the inbred line OELL2000 to make an F1 family. This inbred line was derived from a cross between an oyster from the IFREMER selected strain S89 (see above) and a wild oyster, followed by 4 generations of biparental crosses between full-sibs. Two full-sibs from this F1 family ("30–37" and "30–38") were then placed in an aquarium together in 2004 to obtain the F2 generation. However, microsatellite-based parentage analyses later revealed that all of the F2 offspring came from a self-fertilisation of the F1 parent 30-37 (Lallias 2007).

The second experimental family, Family 2 (Fig. 2), was initiated in 2004 by firstly crossing a wild oyster with an oyster from one of the selected families produced in 1998 during the selective breeding program to produce an F1 family. A second-generation was obtained in 2005 by crossing two full-sibs from this F1 family. Parentage was confirmed by microsatellite analysis (Lallias 2007).

Families 1 and 2 were 20 and 8-month old at the beginning of the experiment.

2.3 Bonamia challenge experiment

Our experimental design consisted of 10 raceways, 5 containing Family 1 with 100 oysters per raceway and

5 containing Family 2 with 110 oysters per raceway. Each raceway contained 4 trays in stacks of two, the 2 upper trays containing the wild oysters and the 2 lower trays the tested oysters. Phytoplankton-enriched sea water was delivered at 150 L h^{-1} for each raceway. Raceways were fully emptied and cleaned only once a week, assuming that it would favor the transmission of the parasite between oysters. The position of each stack was changed at each cleaning: the stack furthest from the water inflow was exchanged with the stack closest to the water inflow. Purification of *B. ostreae* was performed as described in Mialhe et al. (1988) and led to the collection of 443×10^6 parasites from a single heavily-infected oyster. This amount of parasites enabled the injection using syringes of 1×10^6 parasites into the heart cavity of 330 wild oysters after their anesthesia using MgCl_2 (Calloty and Muleahy 1992). For each raceway, 16–17 injected wild oysters and 5–6 non-injected wild oysters were put in each upper tray, the lower tray containing 50 tested oysters.

2.4 Detection of *Bonamia ostreae*

Mortality was checked daily from January until July 2006. The 4 trays were lifted out from the water to drain for at least 30 min before inspecting the oysters and removing any that were gaping, characteristic of dead or dying individuals. A heart imprint was performed on each gaping oyster that consisted of dissecting out the ventricle, drying it on paper and then performing several imprints on a slide. After air drying for 5 min, the slide was then stained with Hemacolor[®] (Merck). Slides were observed under the light microscope ($\times 1000$) and the level of infection by the parasite was characterized according to Hervio et al. (1995) into the following categories:

- negative results (B0^-) when no parasite was detected after 5 min of screening heart imprints from an individual oyster,
- low infections (B0^+) when 10 or fewer parasites were observed during 5 min screening
- moderate infections (B0^{++}) when around one parasite per microscopic field of view was detected,
- heavy infections (B0^{+++}) when several or numerous parasites were observed in each microscopic field of view.

Total shell length (from hinge to outer shell edge) of each dead oyster was measured. Cumulative mortality curves were computed to follow the dynamics of mortality as well as the dynamics of appearance of *B. ostreae* in each raceway.

At the end of the experiment, all remaining oysters from Family 2 were analyzed using heart imprints and the level of infection of the parasite determined as explained above. Oysters from Family 1 were kept alive for further experiments.

2.5 Statistical analyses

Comparisons of mortality and detection frequency were performed by χ^2 test of independence at the end of the challenge experiment. For comparisons of detection frequency among raceways within each family, 2 classes were considered: no parasite infection (B0^-) versus parasite infection

(B0^+ , B0^{++} and B0^{+++} pooled). For comparison of detection frequency between the 2 families, the 4 classes were considered.

Differences in the total length of the dead oysters according to the level of infection by the parasite (B0^+ , B0^{++} , B0^{+++}) were tested for the 2 families by single classification analysis of variance (ANOVA) or by Kruskal-Wallis test (when the data were not normal but the variances were equal). All pairwise comparisons were performed, using Dunn's procedure after Kruskal-Wallis and Bonferroni's method after the ANOVA (MINITAB[®] Release 14 Statistical Software). In all tests a p -value < 0.05 was considered to be statistically significant.

3 Results

3.1 Mortality and level of infection in the two families

Cumulative overall mortalities for the wild and tested oysters of the Family 1 and 2 were analyzed for each of the raceways, as well as the cumulative mortalities of oysters that died containing the parasite (*Bonamia*-positive oysters B0^+ , B0^{++} and B0^{+++} pooled). All the raceways showed a similar pattern, with the first mortalities appearing a few days after the beginning of the experiment in the wild oysters but most mortalities occurring in June and July (140 days post challenge) in the tested oysters. For the two families, no significant differences were found in the number of dead wild oysters nor the detection frequency of the parasite at the end of the experiment among the 5 raceways. Similarly, the number of dead tested oysters and the parasite detection frequencies were homogeneous among the raceways. As a result, data from all 5 raceways were pooled for each tested family.

Over the 6 month period, the cumulative mortality of the wild oysters reached 58.4%. In the last 40 days of the experiment, mortality rate of the wild oysters decreased and the cumulative mortality begins to plateau (Fig. 3). Overall, 66.8% of the wild oysters that died during the challenge experiment were confirmed, by heart imprint, to have the parasite present. Mortality in the tested families began in April (i.e. 70 days post challenge) and mortality of oysters that were *Bonamia*-positive occurred in June and July (Fig. 3). In total, 52 oysters of Family 1 died (9.4%). Reliable heart imprints could not be performed for 11.5% of these oysters because of the degree of tissue decay; 28.8% were diagnosed B0^- , 28.9% B0^+ , 23.1% B0^{++} and 7.7% were B0^{+++} . Among the dead oysters of Family 1 for which a heart imprint could be performed ($n = 46$), the parasite *B. ostreae* could be detected in 67.5%. For Family 2, 105 oysters in total died over the 6 month period (19.1%). Imprints could not be performed for 9.5% of them; 9.5% were B0^- , 16.2% B0^+ , 22.9% B0^{++} and 41.9% were B0^{+++} . Among the dead oysters of Family 2 for which a heart imprint could be performed ($n = 95$), the parasite *B. ostreae* could be detected in 89%. The mortality was significantly higher in Family 2 than in Family 1 ($\chi^2 = 20.87$, $p < 0.001$, 1 d.f.) as well as the intensity of infection by the parasite found in heart imprint ($\chi^2 = 24.34$, $p < 0.001$, 4 d.f.).

Mean mortalities and levels of infection over 10-day periods are presented to illustrate their temporal trends (Fig. 4).

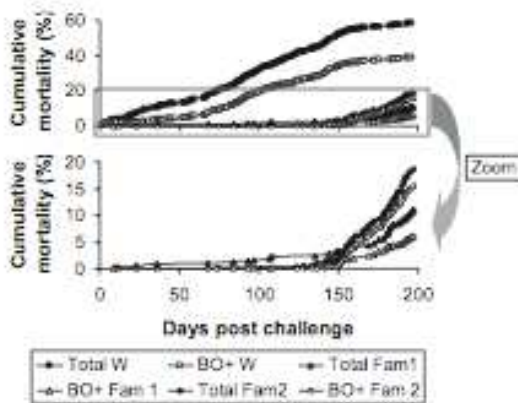


Fig. 3. Cumulative mortalities for the 6 month trial of the challenge experiment. The two upper curves (square) represent the cumulative total mortality (in black = Total W) and the cumulative mortality of oysters infected with the parasite (in white = BO⁺ W) for the wild oysters (upper trays). The 4 lower curves represent the total cumulative mortality (in black = Total) and the cumulative mortality of the *Bonamia*-positive oysters (in white = BO⁺) respectively for the family 1 (triangle) and the family 2 (diamond). Data were pooled across all raceways.

Most of the wild dead oysters that died after the first 50 days of the experiment were moderately to heavily infected with the parasite. It can be seen that the wild oysters died during the whole course of the experiment, potentially leading to a significant source of *Bonamia* infection for the two tested families. In the last 40 days of the experiment, the number of wild oysters that died decreased (Fig. 4a). For Family 1, the few oysters (but one) dying in the first 130 days of the experiment were negative for the presence of the parasite. After that date, the dead oysters mainly exhibited a low to moderate level of infection and only a few heavily infected oysters could be detected (Fig. 4b). For Family 2, only one oyster, negative for the parasite presence, died during the first 80 days of the experiment and the remaining mortalities began 120 days (4 months) after the beginning of the challenge experiment. Contrary to Family 1, most of the dead oysters of Family 2 were moderately to heavily infected with the parasite (Fig. 4c).

3.2 Relationship between shell length and level of infection

Table 1a shows the total length (cm) of the oysters of Family 1 that died during the challenge experiment, depending on their level of infection to the parasite *B. ostreae* (revealed by heart imprint). The mean length ranged from 5.51 cm for the heavily infected oysters (BO⁺⁺⁺) to 5.92 cm for the lightly infected ones (BO⁺). The data were normally distributed (Anderson-Darling $\alpha^2 = 0.681$, $p = 0.070$) and with similar variances (Bartlett's test statistic = 4.23, $p = 0.238$; Levene's test statistic = 1.05, $p = 0.381$) so were analyzed by single classification ANOVA (Table 1b). No significant difference in the total length of the oysters in the 4 groups of parasite

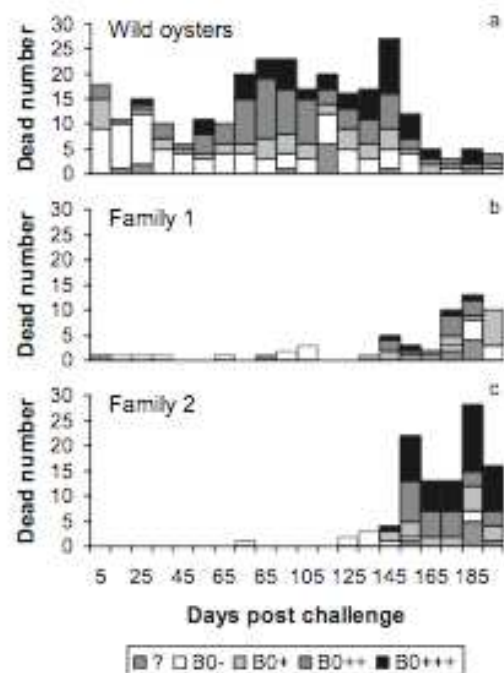


Fig. 4. Kinetics of bonamiosis development for the batch of wild oysters and the two tested families (Family 1 and Family 2). Mortalities were monitored daily and reported every 10 days. *Bonamia* infection intensities (negative (BO⁻), low (BO⁺), moderate (BO⁺⁺) and heavy (BO⁺⁺⁺)) were determined by examination of heart tissue imprints. ? corresponds to dead oysters for which the infection intensity could not be determined because of tissue decay.

level infection could be observed ($F_{3,41} = 0.53$, $p = 0.666$) for Family 1.

The mean shell lengths of Family 2 oysters that died during the challenge experiment ranged from 4.28 cm for the non-infected oysters (BO⁻) to 5.09 cm for the heavily infected oysters (BO⁺⁺⁺) (Table 2a). The data were not normally distributed (Anderson-Darling $\alpha^2 = 1.908$, $p < 0.005$) and could not be made so by log-transformation but exhibited similar variances (Levene's test statistic = 1.16, $p = 0.328$). Therefore the data were analyzed by a Kruskal-Wallis test. Significant difference in the total length of the oysters in the 4 groups of parasite level infection was observed for Family 2 ($H = 8.13$, 3 d.f., $p = 0.043$). However, Dunn's method for all pairwise comparisons between treatment medians revealed no significant differences although the greatest pairwise difference in shell lengths was between BO⁺⁺⁺ and BO⁻ (Table 2b).

3.3 Comparison of the level of infection between the dead and surviving oysters of the Family 2

All the surviving oysters of Family 2 were analyzed by heart imprint after 6 months. Overall, 444 oysters were analyzed, 94 in raceway 8, 85 in raceway 11, 87 in raceway 12,

Table 1. The results and analysis of *Ostrea edulis* total length (cm) at date of death according to their level of infection to the parasite *Bonamia ostreae* during a 6-month challenge experiment (Family 1).

(a) Means, medians and standard deviations of oyster total length (Family 1)

| Infection level | N | Mean length | Median length | SD |
|-------------------|----|-------------|---------------|------|
| B0 ⁻ | 14 | 5.38 | 5.64 | 1.05 |
| B0 ⁺ | 15 | 5.92 | 5.94 | 0.74 |
| B0 ⁺⁺ | 12 | 5.75 | 5.79 | 0.57 |
| B0 ⁺⁺⁺ | 4 | 5.51 | 5.64 | 0.73 |

(b) Analysis of variance table

| Source | DF | SeqSS | MS | F | p |
|-----------------|----|-------|--------|------|-------|
| Infection level | 3 | 1.05 | 0.3488 | 0.53 | 0.666 |
| Error | 41 | 27.15 | 0.6623 | | |
| Total | 44 | 28.20 | | | |

Table 2. The results and analysis of *Ostrea edulis* total length (cm) at date of death according to their level of infection to the parasite *Bonamia ostreae* during a 6-month challenge experiment (Family 2).

(a) Means, medians and standard deviations of oyster total length (Family 2)

| Infection level | N | Mean length | Median length | SD |
|-------------------|----|-------------|---------------|------|
| B0 ⁻ | 9 | 4.28 | 4.50 | 1.09 |
| B0 ⁺ | 17 | 4.71 | 4.66 | 0.84 |
| B0 ⁺⁺ | 23 | 5.05 | 5.15 | 0.52 |
| B0 ⁺⁺⁺ | 44 | 5.09 | 5.02 | 0.88 |

(b) Multiple comparisons between median total lengths using Dunn's procedure after Kruskal-Wallis analysis. Any rank difference, divided by its standard deviation, which is greater than the given value of 2.63 (SE of difference) is significant at the 5% level. Columns are subtracted from rows.

| Infection level | | | |
|-------------------|------|-----------------|-----------------|
| B0 ⁻ | 0.53 | | |
| B0 ⁺ | 1.81 | 1.54 | |
| B0 ⁺⁺ | 2.25 | 2.11 | 0.43 |
| B0 ⁺⁺⁺ | | B0 ⁻ | B0 ⁺ |

95 in raceway 13 and 83 in raceway 14. Most of them were B0⁻ (86.2% for raceway 8, 89.4% for raceway 11, 93.1% for raceway 12, 87.4% for raceway 13 and 88.0% for raceway 14) and almost no B0⁺⁺⁺ oysters were found (0% in raceways 8, 11, 12 and 13; 1.2% in raceway 14). No significant differences between raceways were found for the heart imprint results achieved on the surviving oysters ($\chi^2 = 3.92, p = 0.864, 8 \text{ d.f.}$ after pooling B0⁺⁺ and B0⁺⁺⁺; $\chi^2 = 2.55, p = 0.636, 4 \text{ d.f.}$ after pooling B0⁻, B0⁺⁺ and B0⁺⁺⁺). Therefore, data among the 5 raceways were pooled. Overall, 88.7% of the surviving oysters were not infected with the parasite (B0⁻), 8.4% were slightly infected (B0⁺), 2.7% were moderately infected (B0⁺⁺) and only 0.2% were heavily infected (B0⁺⁺⁺). The difference in the detection frequency between the 2 groups of oysters (dead, surviving) in Family 2 was striking: 89% against 11% of

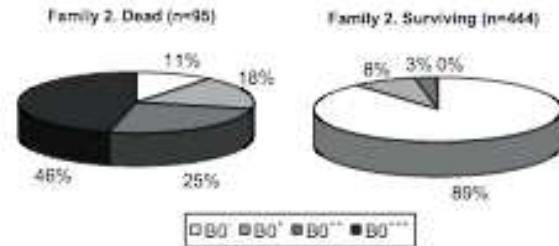


Fig. 5. Comparison of the level of infection of the parasite (after heart imprint) between the two groups of oysters of Family 2, the 95 that died during the 6-month trial (for which a heart imprint could be performed) and the 444 that survived the challenge experiment.

Bonamia-positive in the dead or surviving groups, respectively (Fig. 5).

4 Discussion

4.1 Challenge experiment

Field testing and experimental infection by injection of purified parasite have been widely used for epidemiological studies or in the context of a selective breeding program for resistance to bonamiosis. These methods proved efficient to transmit bonamiosis to flat oysters, leading in some cases to a high percentage of mortality associated with a high prevalence of the parasite (e.g. Tigé and Grizel 1984; Elston et al. 1986; Mialhe et al. 1988; Naciri-Graven et al. 1998).

Cohabitation was chosen in our study because it is likely to mimic the mode of transmission of the disease in the wild. Challenge by injection creates stress and tissue lesion, and would bypass the natural pathway of entry of the parasite into the oyster. Most cohabitation experiments performed so far did not involve the injection of purified parasite in the source oysters (Elston et al. 1986; Elston et al. 1987; Martin et al. 1993; Culloty et al. 1999). In our study, however, wild oysters were injected with the parasite in order to increase the parasite burden in each raceway and to create a "Bonamia pump". It was anticipated that injected wild oysters would infect the non-injected ones before their own death and that this would maintain a high parasite pressure during the course of the experiment. *Bonamia*-positive wild oysters were detected throughout the challenge experiment, indicating the usefulness of this approach (Figs. 3 and 4). Finally, this approach allows some control on the parasite pressure applied because a known number of purified parasites is injected in a known number of oysters, and has proven efficient to infect naïve flat oysters (Culloty et al. 1999).

4.2 Detection of *Bonamia ostreae*

Several diagnostic tools have been used so far for the detection of the parasite *B. ostreae*, either based on light microscopy observation (tissue imprints, haemolymph cell monolayers and histological sections) or PCR-based techniques by amplifying

portions of the 18S rDNA or the ITS of the parasite (Carnegie et al. 2000; Cochenneq et al. 2000). In this study, we chose to perform heart imprint for the detection of *B. ostreae* because this methodology is easy, quick, performed at a low cost and allows high throughput of the data. Heart imprints have been used as a diagnostic tool for the detection of *B. ostreae* in numerous studies (Martin et al. 1993; Hervio et al. 1995; Culloty and Mulcahy 1996; Naciri-Graven et al. 1998; Culloty et al. 1999; Culloty et al. 2004; Lynch et al. 2005) (Annex 1). However, Balseiro et al. (2006) reported that the PCR methodology showed a higher sensitivity than histological and cytological studies particularly at the early stages of infection. An advantage of the heart imprint method is that a semi-quantitative scale for the level of infection with the parasite can be used (BO^- , BO^+ , BO^{++} or BO^{+++}) contrary to a PCR assay in which the band is either present or absent.

Several studies have reported the use of quantitative PCR for the detection of *Bonamia* species. Corbeil et al. (2006), Marty et al. (2006) employed a real-time PCR assay (18S rDNA gene) but the detection did not succeed in being quantitative. Nevertheless, this methodology was faster and increased the sensitivity at low prevalence and severity. A reliable Q-PCR assay for a quantitative estimation of the number of copies of the parasite requires further optimization and standardization (Corbeil et al. 2006).

4.3 Factors controlling transmission of the disease

The first mortalities and infections in the tested oysters occurred in May, i.e. after 4 months of cohabitation (Fig. 3). This compares favorably with the previously reported period of 3 to 6 months for transmission (Poder et al. 1982; Tigé and Grizel 1984; Grizel 1985; Elston et al. 1986; Montes 1991; Hervio et al. 1995; Culloty and Mulcahy 1996; Culloty et al. 2004) (Annex 1). However, some studies of field testing reported a longer time for the transmission of the disease, from 6 to 12 months (Culloty et al. 1999; Montes et al. 2003) (Annex 1). In contrast, experimental infection by direct injection of purified parasite could lead to the first detection of the parasite after only 2 months (Mialhe et al. 1988; Hervio et al. 1995) (Annex 4).

The parallel evolution of the total cumulative mortality and the *Bonamia*-positive cumulative mortality (Fig. 3) led us to conclude that the mortalities observed were most probably due to the parasite *B. ostreae*. However, there was a delay in the detection of the first infections. For example, the wild oysters dying in the first 50 days of the challenge experiment were mainly negative for the parasite or slightly infected (Fig. 4a). This early mortality among the wild oysters was probably due to the stress associated with their transport from Quiberon to La Tremblade, or could be due to tissue damage during the injection process. In the same way, the tested oysters dying first were negative for the presence of the parasite, which could reflect the prepatent period (Fig. 4b,c). However we cannot exclude the hypothesis that some negative (BO^-) individuals might correspond to “false negative” results due to the low sensitivity of heart imprints.

Successful transmission of the disease occurred in both families, but mortalities occurred faster in Family 2

(8 month-old at the beginning of the experiment) than in Family 1 (20 month-old at the beginning of the experiment) ($\chi^2 = 20.87$, $p < 0.001$, 1 d.f.). Also, the infection frequency was significantly lower in Family 1 than in Family 2 ($\chi^2 = 24.34$, $p < 0.001$, 4 d.f.). The cumulative mortalities observed in the 2 families were relatively low (9% in Family 1 and 20% in Family 2, Fig. 3) compared with the study of Culloty et al. (1999) where a 6-month cohabitation trial (injected oysters/naive oysters) resulted in a 32% cumulative mortality in the group of oysters from an area free of *B. ostreae*. A lower parasite pressure in our study could explain the lower cumulative mortality observed in our tested families. Indeed, only 1×10^6 parasites were injected in each of 160 source oysters (for 500 tested oysters), compared with 5×10^6 parasites in each of 100 source oysters (for 150 tested oysters) in Culloty et al. (1999) (Annex 3). However, this lower cumulative mortality might reflect the genetic background of our oysters for which one parent came from a selected strain.

Transmission of the disease also depends on environmental factors such as temperature, salinity or physical manipulation. Indeed, Hine et al. (2002) showed that extreme environmental factors and physical manipulation increased the transmission of *Bonamia exitiosa* to *Ostrea chilensis*, as does crowding among *B. exitiosa*-infected oysters. Audemard et al. (2008) performed laboratory experiments suggesting that warm temperature and high salinity (30 psu) increased *Bonamia* sp. pathogenicity in the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. However, in our study, the two families were held in the same environmental conditions and were subjected to the same manual handling, so non-environmental factors are likely to be responsible for the differences between the two families in the level of the transmission of the disease.

Eight month-old oysters, Family 2, presented higher mortality and detection frequency to the parasite than the 20 month-old oysters, Family 1. This result was inconsistent with the findings of Culloty and Mulcahy (1996) that suggested that 2 year-old was the critical age for the disease development. Therefore, age may not be the key factor in development of the disease, but one of several genetic or environmental factors (Cacères-Martínez et al. 1995). Indeed, Lynch et al. (2005) followed the prevalence and intensity of infection in young prespawning oysters (1–3 month-old to 18 month-old) by heart imprint and PCR techniques and confirmed that such young oysters were susceptible to bonamiosis although they did not report mortality data: after 6 months in the field, prevalence was less than 10% in oysters being 1–3 month-old at the beginning of the experiment (Annex 1). We have shown both susceptibility of young oysters to the disease and mortalities in our experimental conditions.

The most probable cause of the discrepancy in the development of the disease between the 2 tested families was a difference in their genetic background. Both families originated from a cross between a wild oyster and an oyster derived from the IFREMER selective breeding program. However, only Family 2 was directly derived from a selected family (family 98AC703 produced in 1998) (Fig. 2) that had been tested for its resistance to bonamiosis both in the field and by injection. In contrast, Family 1 originated from a 6th generation inbred line that showed no mortality in the field but

whose resistance was not tested by inoculations (Fig. 1). Moreover, because the two families issued from crosses involving two different wild oysters, differences in the rate of infection between the two families could be due to differences in the genomes of the wild oyster parents.

Finally, the heart imprints performed on the surviving oysters of Family 2 (Fig. 5) revealed that 89% of the surviving oysters were not infected by *B. ostreae*. Even if some of those BO⁻ oysters might be slightly infected (due to the low sensitivity of the heart imprint technique), the majority of them are probably truly not infected. Therefore, these results suggest a resistance rather than a tolerance of infection by the parasite.

4.4 Potential implications for the management of flat oysters stocks

Producers commonly observe that mortalities occur in the field in 2.5–3 year-old flat oysters (i.e. when they reach market size). However, our experiment demonstrates for the first time that one year-old oysters can die due to *B. ostreae* infection. Even if no mortality in the spat has so far been reported in the natural environment, our results suggest that specific conditions (such as close contact of spat with infected adult oysters or density) can induce mortalities in such young oysters in relation with the infection to *Bonamia ostreae*. Therefore the potential impact of *B. ostreae* on the dynamics of flat oyster stocks should be further investigated, as early mortality has a more important impact than later one when individuals have already reproduced. However, such phenomenon might favor the natural selection of the more resistant oysters, since the fitness difference between “susceptible” and “resistant” genotypes would be increased in case of earlier mortality.

Acknowledgements. This work was funded by INTERREG IIIB (Atlantic Aquaculture Arc Group, AAAG). The authors would like to thank Dr. Frederico Batista for his useful comments on the manuscript. We thank anonymous reviewers for useful comments and suggestions.

References

- Audemard C., Carnegie R.B., Bishop M.J., Peterson C.H., Bureson E.M., 2008, Interacting effects of temperature and salinity on *Bonamia* sp. parasitism in the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 344–350.
- Balouet G., Poder J., Cahour A., 1983, Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 34, 1–14.
- Balseiro P., Conchas R.F., Montes J., Gómez-Lede J., Novoa B., Figueras A., 2006, Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 261, 1135–1143.
- Barber B.J., Davis C.V., 1994, Prevalence of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* populations in Maine. *J. Shellfish Res.* 13, 298.
- Bucke D., Hepper B., Key D., Bannister C.A., 1984, A report on *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* in the UK. *ICES C.M.* 1984/K 9, 1–7.
- Cáceres-Martínez J., Robledo J.A.F., Figueras A., 1995, Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). *Aquaculture* 130, 15–23.
- Carnegie R.B., Barber B.J., Culloty S.C., Figueras A.J., Distel D.L., 2000, Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Dis. Aquat. Org.* 42, 199–206.
- Cochennec-Laureau N., Auffret M., Renault T., Langlade A., 2003, Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 23–30.
- Cochennec N., Le Roux F., Berthe F., Gérard A., 2000, Detection of *Bonamia ostreae* based on a small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 26–32.
- Comps M., Duthoit J.L., 1976, Infection virale associée à la “maladie des branchies” de l’huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *C. R. Acad. Sci. Paris* 283, Ser. D, 1595–1596.
- Comps M., Tigé G., Grizel H., 1980, Étude ultrastructurale d’un Protiste parasite de l’huître *Ostrea edulis* L. *C. R. Acad. Sci. Paris* 290, Ser. D, 383–385.
- Corbeil S., Arzul I., Diggles B., Heusman M., Chollet B., Berthe F.C.J., Crane M.S.J., 2006, Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.* 71, 75–80.
- Culloty S.C., Cronin M.A., Mulcahy M.F., 2004, Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237, 41–58.
- Culloty S.C., Mulcahy M.F., 1992, An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture* 107, 249–252.
- Culloty S.C., Mulcahy M.F., 1996, Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture* 144, 53–63.
- Culloty S.C., Novoa B., Pernas M., Longshaw M., Mulcahy M.F., Feist S.W., Figueras A., 1999, Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Org.* 37, 73–80.
- Elston R.A., Farley C.A., Kent M.L., 1986, Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Org.* 2, 49–54.
- Elston R.A., Kent M.L., Wilkinson M.T., 1987, Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 64, 237–242.
- Figueras A.J., 1991, *Bonamia* status and its effects in cultured flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 93, 225–233.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2007, FishStat, <http://www.fao.org/fi/statist/FISQFT/FISHPL.US.asp>
- Friedman C.S., McDowell T., Groff J.M., Hollibaugh J.T., Manzer D., Hedrick R.P., 1989, Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linnaeus, in California, USA. *J. Shellfish Res.* 8, 133–137.
- Friedman C.S., Perkins F.O., 1994, Range extension of *Bonamia ostreae* in Maine, USA. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 179–181.
- Grizel H., 1985, Etudes des récentes épizooties de l’huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l’ostréiculture bretonne. Thèse de doctorat, USTL Montpellier.

- Hervio D., Bachère E., Boulo V., Cochennec N., Vuillemin V., Le Cognic Y., Cailletaux G., Mazurie J., Mialhe E., 1995, Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocyte protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture* 132, 183–194.
- Hine P.M., Diggles B.K., Parsons M.J.D., Pringle A., Bull B., 2002, The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochennec-Laureau & Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). *J. Fish Dis.* 25, 545–554.
- Jaziri H., 1985, Biogéographie et polymorphisme enzymatique chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. 1758. Mémoire de DEA, USTL Montpellier.
- Lapègue S., Bédier E., Goyard E., Dégremont L., Baud J.-P., Gérard A., Goulletquer P., Boudry P., 2004, Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole: l'exemple de l'ostréiculture. In: Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Actes Colloq. IFREMER 38, 113–121.
- Lallias D., 2007, Genetic linkage mapping in the blue mussel *Mytilus edulis* and the European flat oyster *Ostrea edulis*, and the search for Quantitative Trait Loci of resistance to a disease in *O. edulis*. PhD thesis, University of Wales, Bangor, College of Natural Sciences, School of Ocean Sciences.
- Launey S., 1998, Marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* L.: caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles. Thèse de doctorat, Institut national agronomique Paris-Grignon.
- Launey S., Barre M., Gérard A., Naciri-Graven Y., 2001, Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genet. Res.* 78, 259–270.
- Le Dumec J., Marteil L., 1976, La reproduction des huîtres. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 40, 233–256.
- Lynch S.A., Armitage D.V., Coughlan J., Mulcahy M.F., Culloty S.C., 2007, Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Exp. Parasitol.* 115, 359–368.
- Lynch S.A., Armitage D.V., Wylde S., Mulcahy M.F., Culloty S.C., 2005, The susceptibility of young, pre-spawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *J. Shellfish Res.* 24, 1019–1025.
- Martin A.-G., Gérard A., Cochennec N., Langlade A., 1993, Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of the resistance of a first selected generation. In: Barnabé G., Kestemont P. (Eds.), *Production, Environment and Quality*. Bordeaux Aquaculture 1992. Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ. No. 18, pp. 547–554.
- Marty G.D., Bower S.M., Clarke K.R., Meyer G., Lowe G., Osborn A.L., Chow E.P., Hannah H., Byrne S., Sojony K., Robinson J.H., 2006, Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture* 261, 33–42.
- McArdle J.F., McKiernan F., Foley H., Jones D.H., 1991, The current status of *Bonamia* disease in Ireland. *Aquaculture* 93, 273–278.
- Mialhe E., Bachère E., Chagot D., Grizel H., 1988, Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 71, 293–299.
- Montes J., 1990, Development of *Bonamia ostreae* parasitosis of flat oyster, *Ostrea edulis*, from Galicia, northwest Spain. In: Perkins F.O., Cheng T.C. (Eds.) *Pathology in Marine Science*, Academic Press, San Diego, CA.
- Montes J., 1991, Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 93, 235–239.
- Montes J., Ferro-Soto B., Conchas R.F., Guerra A., 2003, Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. *Aquaculture* 220, 175–182.
- Montes J., Melendez M.L., 1987, Données sur la parasitose de *Bonamia ostreae* chez l'huître plate de Galice, côte nord-ouest de l'Espagne. *Aquaculture* 67, 195–198.
- Naciri-Graven Y., Martin A.-G., Baud J.-P., Renault T., Gérard A., 1998, Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 224, 91–107.
- Pichot Y., Comps M., Tigé G., Grizel H., Rahouin M.A., 1979, Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 43, 131–140.
- Poder M., Cahour A., Balouet G., 1982, Hemocytic parasitosis in European oyster *Ostrea edulis* L.: pathology and contamination. *Proc. 15th annual meeting of the society for invertebrate pathology*, Brighton, pp. 254–257.
- Tigé G., Grizel H., 1984, Essai de contamination d'*Ostrea edulis* Linné par *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1979) en rivière de Craix (Morbihan). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 328, 3–13.
- Van Banning P., 1985, Control of *Bonamia* in Dutch oyster culture. In: Ellis A.E. (Ed.), *Fish and Shellfish Pathology*. Academic Press, London, pp. 393–396.
- Van Banning P., 1991, Observations on bonamiosis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 93, 205–211.
- Walne P.R., 1974, *Culture of bivalve molluscs: fifty years experience at Conwy*. Whitefriars Press Ltd, London.
- Yonge C.M., 1960, *Oysters*. The New Naturalist, Collins, London.

Annexes 1 to 4. Review of the different methods used to infect the European flat oyster *Ostrea edulis* with *Bonamia ostreae*; mo: month.

Annex 1. Field testing.

| Reference | Technical information | | | | Results | | | | |
|--------------------------------|---|--------------------|----------|-----------------------------------|--|--|--|-----------------------------|---|
| | N tested oysters | Age tested oysters | Duration | Diagnostic method | % mortality | % parasite detection | Time before first mortalities | Level of observed infection | Relation with age/size |
| Poker et al. (1982) | 1500 healthy immersed in contaminated areas; 4 different sites; 15 oysters tested each month | 3-4 years old | 8 mo | histology | only infection data because sampling of only | 7-80% after 8 mo, depending on the site | 3-7 mo before first infections | * | * |
| Tigé and Grizel (1984) | 7 batches of 800 oysters. Each batch put in the field at a different time of the year (march to november) | Unknown | 12 mo | histology | 25-60% after 7 mo, 70-98% after 10-12 mo | 6.6-52% after 5-6 mo, depending on the time of immersion | 4-5 mo | * | * |
| Montes (1991) | sampling after 3 and 6 months in 3 estuaries; density 600 oysters per rope (rafts of 500 m ² with 500 ropes); total of 1418 oysters tested | Unknown | 6 mo | histology and imprint | * | 0-9% after 3 months; 9-31% after 6 mo | 3 mo before first infections | * | * |
| Martin et al. (1993) | 150 oysters per bag, 3 to 5 bags per lot; oysters from programme of selection to bocaniosis (selected) and control (not selected) | 21 mo old | 7 mo | heart and digestive gland imprint | 34% (control); 7% (selected) | 47% (control) and 9% (selected) after 6 mo in surviving | only final sampling | * | * |
| Cáceres-Martínez et al. (1995) | 3 size groups of oysters (small, medium, large) placed in baskets on rafts; 20-30 oysters of each group collected monthly | 18 mo old | 8 mo | histology | >40% (small and medium); 32% (large) | 20-30% at the last sampling date, no cumulative data | 0-2-4 mo (large, medium and small respectively) for first infections | * | positive relation between Bocanmia presence and mean total length |

Annex 1. Continued.

| Reference | Technical information | | | | Results | | | Relation with age/size |
|-----------------------|---|---------------------|----------|-------------------|---|--|--|---|
| | N tested oysters | Age tested oysters | Duration | Diagnostic method | % mortality | % parasite detection | Time before first mortalities | |
| Momtes et al. (2003) | 3 hatchery produced stocks cultivated on rafts in a contaminated area; sampling of at least 30 oysters of each stock every 3 months | 4 mo old | 24 mo | histology | 8–28% after 9 mo; 32–55% 15 mo; 74–100% after 21 mo | 13–27% after 15 mo; 33–60% after 21 mo | 12 mo before first | |
| Culloty et al. (2004) | 1 selected stock (S) and 4 stocks from parasite-free area (I); 700 oysters, 70 oysters per bag; lower shore, oyster bags on trestles 40 cm off bed; exposed only at spring tide; 30 oysters of each memba, 7.7–17.6 °C. Site 1 | mean weight 57–67 g | 22 mo | heart imprint | 20%, 44%, 86% after 6, 12 or 19 mo (S); 5–16%, 38–73%, 96–100% after 6, 12 or 19 mo (I) | 18% after 6 mo, 25% after 12 mo, 50% after 19 mo (S); 4–79% after 6 mo, 77–100% after 12 mo, 50–100% after 19 mo (I) | 3–6 mo before first infections (I); selected stock infected at beginning of experiment | 0–14% after 6 mo; 7–63% after 12 mo; 0–33% after 19 mo of +++ |
| | 1 selected stock (S), 1 stock from contaminated area (C) and 4 stocks from parasite-free area (I); 700 oysters, 70 oysters per bag; oyster bags on trestles; continually covered; 30 oysters of each stock tested every 3 months. 3.1–20.4 °C. Site 2 | mean weight 57–67 g | 12 mo | heart imprint | 44% or 84% after 6 or 12 mo (S); 40% or 82% after 6 or 12 mo (C); 70–98% or 100% after 6 or 12 mo (I) | 41% or 55% after 6 or 12 mo (S); 77% or 8% after 6 or 12 mo (C); 63–100% or 22% after 6 or 12 mo (I) | 3–6 mo before first infections (I and C); selected stock infected at beginning of experiment | 0–30% after 6 mo; 0–9% after 12 mo of +++ |
| | 1 selected stock (S), 1 stock from contaminated area (C) and 4 stocks from parasite-free area (I); 700 oysters, 70 oysters per bag; oyster bags on trestles; continually covered; 30 oysters of each stock tested every 3 months. 9.9–16.3 °C. Site 3 | mean weight 57–67 g | 16 mo | heart imprint | 12%, 72% or 78% after 6, 12 or 16 mo (S); 56%, 98% or 56%, 98% or 12 or 16 mo (C); 12–50%, 38–96% or 94–100% after 6, 12 or 16 mo (I) | 14%, 6% or 28% after 6, 12 or 16 mo (S); 29% or 14% after 6 or 12 mo (C); 0–12%, 0–after 6, 12 or 16 mo (I) | 3 mo before first infections (I and C); selected stock infected at experiment | most infections observed were light |

Annex 1. Continued.

| Reference | Technical information | | | | Results | | | | |
|---------------------|---|--------------------|----------|-----------------------|-------------|---|--|-----------------------------|---|
| | N tested oysters | Age tested oysters | Duration | Diagnostic method | % mortality | % parasite detection | 1 mo before first mortalities | Level of observed infection | Relation with age/size |
| Lynch et al. (2005) | 1000 oysters deployed in two different sites; stock from parasite-free area; 200 oysters per bag; bags placed intertidally on trestles 40 cm off bed; 60 oysters tested every 2s months | 1 mo old | 6 mo | heart imprint and PCR | - | 2–3% imprint or 0–7% (PCR) after 4 mo; 9% (heart imprint) or 3–9% (PCR) after 6 mo | 2–4 mo before first infections depending on the site | + until 4 mo, ++ after 6 mo | older oysters with higher prevalence of infection and higher intensity of infection |
| | 200 oysters deployed in one site; stock from contaminated area; 200 oysters per bag; bags placed intertidally on trestles 40 cm off bed; 60 oysters tested every 2 months | 2–3 mo old | 6 mo | heart imprint and PCR | - | 5% (heart imprint) or 10–17% (PCR) after 4 mo; 6% (heart imprint) or 0–12% (PCR) after 6 mo | initial sample with low frequency of the parasite (0–6%) | + | |
| | 1000 oysters deployed in two different sites; 1 stock from parasite-free area (I) and 1 stock from contaminated area (C); 200 oysters per bag; bags placed intertidally on trestles 40 cm off bed; 60 oysters tested every 2 months | 18 mo old | 6 mo | heart imprint and PCR | - | 5–14% (heart imprint) or 6–54% (PCR) after 6 mo (I); 7–26% (heart imprint) or 14–50% (PCR) after 6 mo (C) | 2–4 mo before first infections | +, ++, +++ | |

-, missing information or result; +, light infection, ++, moderate infection, +++, heavy infection.

Annex 2. Cohabitation experiment without injection of the parasite (source oysters come from a contaminated area).

| Reference | Technical information | | | | | | Results | | |
|-----------------------|---------------------------------------|---|--|-----------|----------|-----------------------------------|---|---|--|
| | N source oysters (initial prevalence) | N tested oysters (initial prevalence) | Experimental conditions | Age | Duration | Diagnostic method | % mortality | % parasite detection | Time before first mortalities |
| Elston et al. (1986) | 55 (unknown) | 30 (zero) | Unknown | Unknown | 9 mo | histology | 100% | 83% | 3–4 months |
| Elston et al. (1987) | 58 (at least 30%) | 58 (zero) | 50 L tank, flow of 2 l/min seawater, 11–17 °C | Unknown | 11 mo | histology | 26% (source), 98% (tested) at the end of experiment | 12% (source), 12% (source) at the end of experiment | 4 weeks (<10%) until week 28 |
| Martin et al. (1993) | 150 (40–50%) per batch | 2 batches (control and selected); 250 per hatch (0% selected; 8% control) | 15–18 °C, fed with 4.10 ⁶ cells/h/100 l tank; system; water renewed during 1 h every 24 h | 21 mo old | 7 mo | heart and digestive gland imprint | 30% (control); 10% (selected) | 50% (control) 44% (selected) after 7 months in surviving | week 2 for selected (<5% until week 17); week 5 for control (<10% until week 20) |
| Collopy et al. (1999) | 87 (25%) | 150 (parasite-free area) | 500 L static tank, aerated, sea water changed 3 times a week, 8–15 °C, daily food | Unknown | 6 mo | heart imprint | 91.6% (source oysters); 19.5% (tested oysters) | 66.7% (source oysters); 46.6% (tested oysters) at the end of 6 months | * |

* missing information or result.

Annex 3. Cohabitation experiment with injection of the parasite (source oysters injected with *Bonamia ostreae*).

| Reference | Technical information | | | | | | Results | | | |
|-----------------------|---|---------------------------------------|--|-----------|----------|-------------------|--|---|---|--|
| | N source oysters (Bonamia injected) | N tested oysters (initial prevalence) | Experimental conditions | Age | Duration | Diagnostic method | % mortality | % parasite detection | Time before first mortalities | Level of observed infection |
| Culloty et al. (1999) | 100 (5 × 10 ⁶ cells injected in each oyster) | 150 (zero) | 500 L static tank, aerated, sea water changed 3 times a week, 8–15 °C, daily food | Unknown | 6 mo | heart imprint | 53.3% (source) and 12.5% (source) moribund oysters; 80.4% (source) and 22.1% (tested) in the surviving oysters | 31.2% (source) and 12.5% moribund oysters; 80.4% (source) and 22.1% (tested) in the surviving oysters | - | - |
| This study | 220 (1 × 10 ⁶ cells injected in each of 160 oysters) | 500 Family 1 | 5 × 150-L tanks; each tank containing 100 tested oysters and 44 source oysters (32 injected); water flow 150 L h ⁻¹ ; daily food; sea water changed once a week | 20 mo old | 6 mo | heart imprint | 58% (source); 9.4% (tested) | 67.5% in the moribund oysters (tested) | 4 months before first infections (tested) | 33% of +, 26% of ++ and 9% of +++ after 6 mo in the dead oysters (tested) |
| | 220 (1 × 10 ⁶ cells injected in each of 170 oysters) | 550 Family 2 | 5 × 150-L tanks; each tank containing 110 tested oysters and 44 source oysters (34 injected); water flow 150 L h ⁻¹ ; daily food; sea water changed once a week | 8 mo old | 6 mo | heart imprint | 58% (source) 19.1% (tested) | 89.5% in the moribund oysters (tested); 11% in the surviving oysters (tested) | 4 months before first infections (tested) | 18% of +, 25% of ++ and 66% of +++ after 6 mo in the dead oysters (tested); 8% of + and 3% of ++ in the surviving oysters (tested) |

-: missing information or result; +: light infection, ++: moderate infection, +++: heavy infection.

Annex 4. Experimental infection by injection of purified parasite.

| Reference | Technical information | | | | | Results | | | | | |
|----------------------|--|---|---|-------------------------|-------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--|--|-----------------------------|
| | N oysters | Experimental conditions | Inoculation location | N Bonamia injected | Age | Duration | Diagnostic method | % mortality | % parasite detection | Time before first mortalities | Level of observed infection |
| Mialhe et al. (1988) | 3 batches of 30 oysters (parasite-free area) | - | digestive gland | - | Unknown | 4 mo | gill tissue imprint | 100% after 4 mo | 50% after 2 mo, 100% | - | - |
| Martin et al. (1993) | 2 batches (control and selected); 250 per batch; initial prevalence 0% (selected) and 8% (control) | 15–18 °C; fed with 4×10^6 cell h^{-1} 100 L $^{-1}$ tank; closed system; water renewed during 1 h every 24 h | heart (after anaesthesia with MgCl $_2$) | 50 000 cells per oyster | 21 mo old | 7 mo | heart and digestive gland imprint | 52.4% (control); 28% (selected) | 68% (control) and 51% (selected) after 7 mo in surviving control (<10% until week 23); week 1 for control (<10% until week 19) | weeks 15 for selected <10% until week 23); week 1 for control (<10% until week 19) | + |
| Hervio et al. (1995) | 30 (zero) and 43 (zero) | 50-L tank, digestive recirculating filtered sea-water (10 μ m) changed weekly, 18 °C | digestive gland | 3 years | 4 mo old | heart imprint 4 mo | 26% after 4 mo | 34% after 4 mo | 4 months 4 mo | + | + |
| Hervio et al. (1995) | 100 (zero) | 200-L tank, recirculating filtered sea-water (10 μ m) changed weekly, 18 °C | digestive gland | 220 000 | 3 years old | 4 mo | heart imprint | 43% after 4 mo | 69% after 4 mo before + + + | infections first 2 months | + |
| Hervio et al. (1995) | 100 (zero) | 200-L tank, recirculating filtered sea-water (10 μ m) changed weekly, 18 °C | digestive gland | 220 000 | 3 years old | 4 mo | heart imprint | 43% after 4 mo | 52% after 4 mo | infections first 2 months before first infections | + |

Annex 4. Continued.

| Reference | Technical information | | | | | Results | | | | | |
|-----------------------|---|---|----------------------|--------------------|---------------|---------------------------------|-------------------|---|--|------------------------------------|---------------------------------------|
| | N oysters | Experimental conditions | Inoculation location | N Bonamia injected | Age | Duration | Diagnostic method | % mortality | % parasite detection | Time before first mortalities | Level of observed infection |
| Hervio et al. (1995) | 4 groups containing each 160, 43, 97 or 61 oysters (2 different locations) | 200-L tank, recirculating filtered sea-water (10 µm) changed weekly, 18 °C | digestive lund | 100 000 | 3-4 years old | 6 mo | heart imprint | 32-79% after 6 mo, depending on the group (32% for "resistant" group) | 20-69% after 6 mo, depending on the group (20% for "resistant" | 2-4 months before first infections | +, ++, +++ (14-51% of +++ after 6 mo) |
| Culloty et al. (1999) | 180 (zero); 30 oysters tested after 2 weeks and remaining ones after 6 months; 19 (zero); hemolymph tested after 7 weeks; remaining ones after 6 months | 500-L static tank, aerated, sea water changed 3 times a week, 8-15 °C, daily food | mantle cavity | 5 000 000 | Unknown | 6 mo | heart imprint | 53% after 6 mo | 31.2% in moribund; 80.4% surviving oysters | - | - |
| | 75-L tank, aerated, daily food, filtered and UV treated sea water | mantle cavity | 4 150 000 | Unknown | 6 mo | hemolymph imprint and histology | 5.2% after 6 mo | 100% after 6 mo in moribund; 29.6% in surviving oysters | - | - | - |

-: missing information or result, -: light infection, ++: moderate infection, +++: heavy infection

TITRE : Étude des interactions hôte/parasite chez l'huître plate *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*.

RESUME : L'histoire de l'ostréiculture française met en évidence la fragilité de cette production face à la surexploitation des stocks et l'apparition de maladies. En particulier, la production d'huître plate, *Ostrea edulis*, a fortement diminué suite à l'apparition de deux maladies parasitaires dont la bonamiose. Les moyens de lutte contre la bonamiose sont relativement restreints. Ils sont essentiellement basés sur la surveillance de la santé des huîtres afin de limiter la dissémination et la propagation de la maladie. Cependant l'utilisation de modèles prédictifs de l'évolution de la maladie en zone infectée permettrait d'optimiser la gestion des stocks et minimiser l'impact des agents pathogènes. De plus, le développement d'animaux résistants à l'infection pourrait permettre de relancer cette production. Ces différentes approches nécessitent des outils diagnostiques adaptés, une bonne connaissance du cycle de vie de l'agent pathogène, et, plus particulièrement des interactions du parasite avec son hôte. Dans ce contexte, l'objectif principal du travail de thèse proposé est de comprendre les interactions entre l'huître plate *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*, et, plus particulièrement les bases moléculaires de la résistance au parasite. Dans un premier temps, la réalisation d'une banque soustractive d'ADNc a permis d'identifier des ESTs différenciellement exprimées chez des hémocytes en réponse au parasite. L'expression de certains gènes dont une galectine a été mesurée en PCR en temps réel dans le contexte d'infections *in vitro*. En complément, la réponse cellulaire a été étudiée par cytométrie en flux et l'infection contrôlée en microscopie. Ces expériences ont montré une multiplication parasitaire dans les hémocytes au cours du temps associée à une diminution de la production d'EOR et d'estérases. Dans un second temps, il a été entrepris une étude comparative entre une population d'huîtres plates résistantes à la bonamiose et une population naturelle. Les résultats obtenus tendent à montrer qu'une modulation de l'apoptose et une diminution de la phagocytose seraient impliquées dans les mécanismes liés à la résistance à la bonamiose. Ce travail est le premier à étudier la réponse des hémocytes d'huîtres plates à une infection par le parasite *Bonamia ostreae* au niveau cellulaire et moléculaire.

MOTS-CLES : huître plate, *Ostrea edulis*, bonamiose, *Bonamia ostreae*, interaction hôte-parasite, expression, résistance, hémocytes, hybridation soustractive suppressive

TITLE : Study of host/parasite interactions in the flat oyster *Ostrea edulis* and the parasite *Bonamia ostreae*.

ABSTRACT : The history of the French oyster production highlights the fragility of this production against overexploitation and disease outbreaks. In particular, the production of flat oyster, *Ostrea edulis*, has decreased following the emergence of two parasitic diseases including bonamiosis. The means to fight against bonamiosis are relatively limited. They are mainly based on oyster health surveillance to limit the spread of the disease. However, the use of predictive models of disease progression in infected area would help to improve stock management and minimize the impact pathogens. Moreover the development of resistant animals could help to revive this production. These different approaches require appropriate diagnostic tools, a good knowledge of the life cycle of the pathogen, and the interactions between the parasite and its host. In this context, the main objective of the PhD work is to understand the interactions between the flat oyster *Ostrea edulis* and the parasite *Bonamia ostreae*, and particularly the molecular basis of the resistance to the parasite. In a first step, a subtractive cDNA bank allowed the identification of ESTs differentially expressed in haemocytes in response to the parasite. Expression of some genes, among which a galectin, was measured by Real Time PCR in the context of *in vitro* infections. In addition, the cellular response was investigated by flow cytometry and the infection was checked by microscopy. These experiments showed a multiplication of the parasite inside haemocytes associated with a decreased of esterases and of the production of ROS. In a second step, a comparative approach was carried out between a population of oysters resistant to bonamiosis and a natural population. Results suggest that modulation of apoptosis and decrease of phagocytosis could be involved in mechanisms related to resistance to bonamiosis. This work is the first study on the response of haemocytes of flat oysters to an infection with the parasite *Bonamia ostreae* at the cellular and molecular levels.

KEY WORDS: flat osyter, *Ostrea edulis*, bonamiosis, *Bonamia ostreae*, interaction host-parasite, expression, resistance, haemocytes, suppressive subtractive hybridization
