

**UNIVERSITE MONTPELLIER II**  
**SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**THÈSE**

*Pour l'obtention du grade de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

*Formation Doctorale : Parasitologie*  
*Ecole Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé*

**Contribution à l'étude de l'ontogenèse du système  
immunitaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas***

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Ana Tirapé Bajaña**

*Le 11 Mai 2007*

*Devant le jury composé de :*

Pr. Pascal FAVREL, Université de Caen	Rapporteur
Pr. Franck VANDENBULCKE, Université Sciences et Technologies de Lille	Rapporteur
Pr. Guy CHARMANTIER, Université de Montpellier II	Examineur
Dr. Eric MIALHE, Concepto Azul, Equateur	Examineur
Pr. Guillaume MITTA, Université de Perpignan	Examineur
Dr. Viviane BOULO, IFREMER, Montpellier	Responsable scientifique

## AVANT PROPOS

C'est avec un enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais remercier tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui m'ont permis de bénéficier d'une bourse du gouvernement français et d'un financement pour réaliser cette thèse. J'associe à ces remerciements l'EGIDE et plus particulièrement Mme. Snellings qui a contribué au bon déroulement de cette thèse par la gestion administrative de mon dossier et par sa disponibilité.

Je tiens à remercier M. François Bonhomme, Directeur de l'UMR-5171 GPIA, IFREMER-CNRS-Université de Montpellier II qui m'a accueillie dans son laboratoire, dans un cadre propice pour mener à bien ce travail au sein de l'équipe Réponse Immunitaire.

Mes remerciements s'adressent également à Evelyne Bachère pour avoir accepté la direction de cette thèse malgré ses nombreuses obligations.

M. Pascal Favrel, a accepté de faire partie de ce jury, je l'en remercie sincèrement pour avoir accepté d'examiner cette thèse et pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à M. Franck Vandebulcke pour avoir accepté de juger ce travail, pour son immense disponibilité et pour ses nombreux conseils lors de mon séjour dans son laboratoire. Merci Franck pour avoir toujours manifesté un intérêt dans l'évolution de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes sincères remerciements à Messieurs Guy Charmantier et Guillaume Mitta qui me font l'honneur d'être examinateurs de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Eric Mialhe, pour le grand honneur qu'il me fait en étant présent dans ce jury. Il a été l'initiateur de ma formation doctorale. Merci Eric de m'avoir inculqué l'intérêt pour la science, également pour ta confiance et ton amitié. C'est avec beaucoup de plaisir que je vais retrouver l'équipe de Concepto Azul pour poursuivre le travail que nous avons commencé avant mon arrivée en France.

Je remercie chaleureusement Viviane Boulo, la personne qui a su me soutenir tout au long de cette période, jusque dans les moments parfois désespérés. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide, ta grande disponibilité, tes précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. Je ne peux pas oublier de mentionner ta rigueur scientifique qui a motivé toutes mes recherches au cours de cette thèse ainsi que les précédentes. Je rêve qu'elles puissent en devenir une digne continuation. C'est un véritable bonheur de travailler à tes côtés. Sois assurée, Viviane, de tout mon respect, mon amitié et de ma profonde gratitude.

Un remerciement spécial que j'adresse aux personnes du Laboratoire Ecologie Numérique et Ecotoxicologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, plus particulièrement à Franck Brulle pour avoir répondu à toutes mes questions de Stat et à Régine Leroux pour son aide pendant les manips de HIS et bien sûr pour votre participation à l'amélioration de mon français. Merci à tous de votre accueil chaleureux et convivial.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à l'équipe du Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER de La Tremblade, notamment l'équipe de l'écloserie,

dont leur implication a été primordiale pour l'obtention des différents stades de développement de l'huître et le bon déroulement des élevages. Merci beaucoup à tous et plus particulièrement à Raphaël Brizard, Pascal Phelipot, Jean-Christophe Billy, Christophe Ledu et Serge Heurtebise pour la bonne organisation et leur disponibilité lors de mes petits séjours à La Tremblade. Un grand merci aussi à Nicole Faury pour sa gentillesse, son aide et son accueil chaleureux. J'ai sincèrement apprécié mes séjours parmi vous.

Mes remerciements les plus sincères et chaleureux aux collègues de l'équipe Réponse Immunitaire Thierry Noël, Delphine Destoumieux-Garzon, Jean-Luc Roland, Yannick Gueguen, Marco Leroy, Bernard Romestand et Julien de Lorgeril, auxquels j'associe ceux qui sont partis, Julien Garnier, Julie Fievet, Brigitte Zattara. Je remercie plus particulièrement Delphine, Julien, Yannick, Bernard et Jean-Luc pour avoir ces derniers mois consacré une partie de leur temps précieux à la lecture de ce manuscrit et de m'avoir donné des conseils. J'associe à ces remerciement Jean-Michel Escoubas et Caroline Montagnani notamment pour les discussions fructueuses sur Timp et MyD88.

Je voudrais aussi remercier l'équipe AEO dirigée par M. Guy Charmantier, plus particulièrement Mireille Charmantier et Evelyse Grousset pour leur aide précieuse en histologie. Je garderai un bon souvenir d'Evelyse le jour où elle m'a dit « un résultat négatif est aussi un résultat ».

Merci à Marie Christine Guérin, pour sa gentillesse, sa disponibilité et les précieux conseils concernant la Q-PCR.

Je voudrais également remercier tout particulièrement Coralie Bacque et Perrine Lallemand, qui au cours de leurs stages ont contribué à faire progresser le travail de cette thèse, mais aussi à améliorer mon français. A toutes les deux milles mercis et je vous souhaite une bonne continuation.

Une pensée très amicale pour tous les étudiants, post-doc et CDD avec qui j'ai partagé une salle, un café, un repas ou une console d'ordinateur pendant ces dernières années: Benoît, Kunlaya, Alexandra, Cinzia, Marina, Marcelo, Valérie, Catherine, Paola, Anaïs, N'Golo, Mike, Jill et Mylène. Bon courage à Idalia, Ivone et Mbaye, qui bientôt commencent à rédiger leur mémoire de thèse. Enfin aux derniers « petits thésards », Pauline, Reda et Charlotte qui débutent juste, bon courage et plein de bons résultats.... A vous tous, je vous souhaite des réussites pour la suite.

Je souhaite exprimer ma profonde amitié et mes remerciements à mes amis de France et d'Equateur pour leurs encouragements lors de mon séjour à la France (*Gracias amigos, por el animo que me dieron durante mi estancia en Francia*) Elena, Sofia, Gabriela, Chris, Nancy, Linda, Richard, Sabine, Jorge, Virna, Emmerik, Gégé, Gaël, Mónica, Rocio 1, Rocio 2, Bangi, Jacky, Francisco, Leandro, Grabriel,.....

Mis sinceros agradecimientos al equipo de Concepto Azul en Ecuador, por la oportunidad que me dieron de comenzar con unas practicas en su laboratorio, que luego se convirtieron en un trabajo, una maestria, un doctorado.... Gracias por la confianza Amigos.

Yo termino este agradecimiento con un gran **GRACIAS** a mi familia, por el cariño y apoyo que siempre me han dado.

## SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	6
<b>INTRODUCTION</b> .....	8
<b>PREMIERE PARTIE</b> .....	11
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	12
<b>I. Modèle d'étude, l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i></b> .....	14
I. 1. Position Phylogénétique.....	14
I. 2. Systématique.....	14
I. 3. Cycle de vie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> .....	16
I. 3. 1. Développement embryonnaire.....	16
I. 3. 2. Développement larvaire et métamorphose.....	19
<b>II. Système immunitaire chez l'huître adulte</b> .....	23
II. 1. Généralités.....	23
II. 2. Les hémocytes.....	23
II. 2. 1. Types hémocytaires et hématopoïèse.....	23
II. 2. 2. Ontogenèse des hémocytes.....	24
II. 2. 3. Fonctions des hémocytes.....	26
II. 3. Mécanismes de défense à médiation cellulaire.....	26
II. 3. 1. Infiltration hémocytaire.....	27
II. 3. 2. Phagocytose.....	27
II. 3. 2. 1. Reconnaissance et fixation du « non-soi » sur l'hémocyte.....	27
II. 3. 2. 2. Dégradation intracellulaire.....	28
II. 3. 3. Encapsulation.....	30
II. 3. 4. Prolifération cellulaire.....	30
II. 4. Effecteurs de l'immunité innée chez les Bivalves.....	31
<b>III. Agents pathogènes et mortalités estivales chez l'huître</b> .....	38
III. 1. Agents pathogènes.....	38
III. 1.1 Bactéries.....	38
III. 1. 2. Virus.....	40
III. 1. 3. Protozoaires et Champignons.....	42
III. 2. Mortalités Estivales.....	43
<b>IV. Moyens de lutte contre des maladies</b> .....	44
IV. 1. Pratiques d'élevage.....	44
IV. 2. Prévention et traitements.....	45
IV. 3. Sélection génétique.....	47
<b>V. La réponse de l'hôte au cours de l'ontogenèse</b> .....	48

<b>SECONDE PARTIE : RESULTATS</b> .....	51
<b>CHAPITRE I: Etude de l'expression des gènes potentiellement impliqués dans l'immunité au cours de l'ontogenèse chez l'huître, <i>Crassostrea gigas</i></b> .....	52
<i>Publication 1</i> : The two <i>Cg-timp</i> mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis.....	56
<i>Publication 2</i> : Expression of immune-related genes in the Oyster <i>Crassostrea gigas</i> during ontogenesis.....	65
<i>Résultats complémentaires</i> : Analyse de l'expression de gènes potentiellement impliqués dans l'immunité au cours du développement chez <i>Crassostrea gigas</i> après mise en contact avec un milieu de culture stérile et des bactéries tuées.....	80
1. Introduction.....	80
2. Animaux et protocole expérimental.....	80
3. Résultat.....	81
3. 1. Expression relative des gènes après exposition avec du milieu de culture stérile aux stades précoces de développement.....	81
3. 2. Expression relative des gènes après un challenge bactérien du naissain.....	83
4. Discussion.....	84
<b>CHAPITRE II : Identification de gènes différentiellement exprimés chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i> au cours de l'ontogenèse</b> .....	88
<i>Publication 3</i> : Molecular identification and expression study of genes differentially expressed in the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> during the ontogenesis.....	91
<b>CHAPITRE III : Caractérisation et étude de l'expression de <i>Cg-MyD88</i>, une protéine adaptatrice de la voie de signalisation IL-1 et Toll-like récepteur, avec un rôle potentiel dans l'immunité innée pendant l'ontogenèse chez l'huître, <i>Crassostrea gigas</i></b> .....	122
<i>Publication 4</i> : A novel gene, <i>Cg-MyD88</i> in the Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> with a potential role in immunity.....	125
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	146
<b>LISTE DES PUBLICATIONS</b> .....	162
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	164

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ATP	Adénosine Triphosphate
bp	base pair
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
C-terminale	Carboxy-terminale
DD-PCR	Differential Display-PCR
ECSIT	Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways
EPS	Eau de Peptone saline
EST	Expresses Sequence Tag
FAO	Food and agriculture organization
GTP	Guanosine triphosphate
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
IL-1R	Interleukin-1 receptor
IRAK	IL-1 receptor-associated serine/threonine kinase
LPS	lipopolysaccharide
MAL	MyD88 adaptator-like
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
N-terminale	Amino-terminale
oIKK	Oyster I $\kappa$ B kinase-like protein
OsHV1	Ostreid Herpesvirus 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive Oxygen Species
SSH	Suppressive subtraction hybridization
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TIR	Toll-Interleukin-1 récepteur
TLR	Toll-like récepteur
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR-domain containing adaptor inducing INF- $\beta$

## **INTRODUCTION**



L'ostréiculture en France assure la quasi-totalité de la production européenne (90%) et se situe au 4ème rang mondial, derrière la Chine, le Japon et la Corée qui totalisent 93% de la production mondiale (FAO, 2005). Avec une production de 128.000 tonnes en 2003, l'huître creuse *Crassostrea gigas* est une espèce de haute valeur commerciale en France. L'huître est cultivée dans le milieu naturel soumis à un environnement dont les conditions écologiques sont en constante évolution. Dans les zones côtières et lagunaires, ces conditions écologiques couplées aux pratiques d'élevages ont un impact certain sur le maintien de l'homéostasie des animaux qui correspond à sa capacité à maintenir un état de stabilité relative de ses différents systèmes physiologiques afin d'assurer sa survie. Au cours des dernières décennies, l'acquisition de connaissances de la biologie des huîtres, en particulier de la reproduction et de la croissance, a contribué à des progrès zootechniques importants qui ont conduit à une intensification des productions aquacoles. La conséquence directe de cette intensification des élevages et du transfert des animaux entre zones d'élevage est le développement de maladies infectieuses qui sont le principal frein à la pérennité des activités aquacoles.

En effet, le développement de la production de l'huître creuse est principalement entravé par des épizooties de type bactérioses et plus particulièrement des vibrioses (Nicolas et al., 1992; Sugumar et al., 1998; Paillard et al., 2004) et de type viroses tel que l'herpès « virus-like » (Renault et al., 1994a; Arzul et al., 2001). De plus, les zones ostréicoles sont soumises à des épisodes de contamination par des phycotoxines provenant de dinoflagellés ayant des conséquences nocives pour les huîtres comme par exemple *Gymnodinium mikimotoi* (Gárate-Lizárraga et al., 2004), ou pour le consommateur comme c'est le cas du *Dinophysis* et *Alexandrium* qui sont responsables des marées rouges (Asakawa et al., 2006).

Ainsi, l'acquisition de connaissances sur la physiologie de l'huître et plus particulièrement sur les mécanismes de défense sont d'une importance primordiale pour comprendre sa susceptibilité vis-à-vis de microorganismes agresseurs. Cette susceptibilité étant différentielle entre les jeunes stades, les juvéniles et les adultes.

La réponse immunitaire chez l'huître, comme celle des autres invertébrés est dite innée par opposition au système dit acquis (à mémoire cellulaire) des vertébrés. Les hémocytes ou cellules immunocompétentes sont les cellules clés de l'immunité de l'huître. Ces dernières décennies, des recherches ont été focalisées sur l'immunité cellulaire, contribuant à la compréhension du rôle des hémocytes dans l'immunité (Cheng 1981). Plus récemment, le développement de la génomique fonctionnelle a conduit à l'acquisition de connaissances sur les effecteurs moléculaires de la défense antimicrobienne chez l'huître adulte (Bachère et al., 2004). Plusieurs outils ont été développés pour acquérir des données sur un grand nombre de

gènes exprimés dans l'organisme ou dans un tissu donné, tels que la construction des banques d'ADN génomique (Hedgecock et al., 2005), des banques d'ADN complémentaire conduisant à des collections d'EST (« Expressed Sequences Tag ») (Gueguen et al., 2003; Saavedra et Bachère, 2006). Actuellement, la disponibilité de ces outils de génomique a permis l'identification de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans les grandes fonctions biologiques et en particulier l'immunité, mais aussi à l'analyse globale du transcriptome de l'huître (Jenny et al., sous presse).

A ce jour, malgré les progrès sur la connaissance du système immunitaire de l'huître adulte, l'information sur les mécanismes de défense aux premiers stades du cycle de vie est encore peu documentée. Les travaux exposés dans cette thèse s'inscrivent dans ce contexte et ont pour objectif de définir la mise en place du système immunitaire au cours du développement. Ce travail, réalisé au laboratoire Génome Populations Interactions Adaptation (UMR5171 CNRS-IFREMER-Université Montpellier II) au sein de l'équipe «Réponse Immunitaire, Aquaculture, Environnement», vous est présenté en 2 parties.

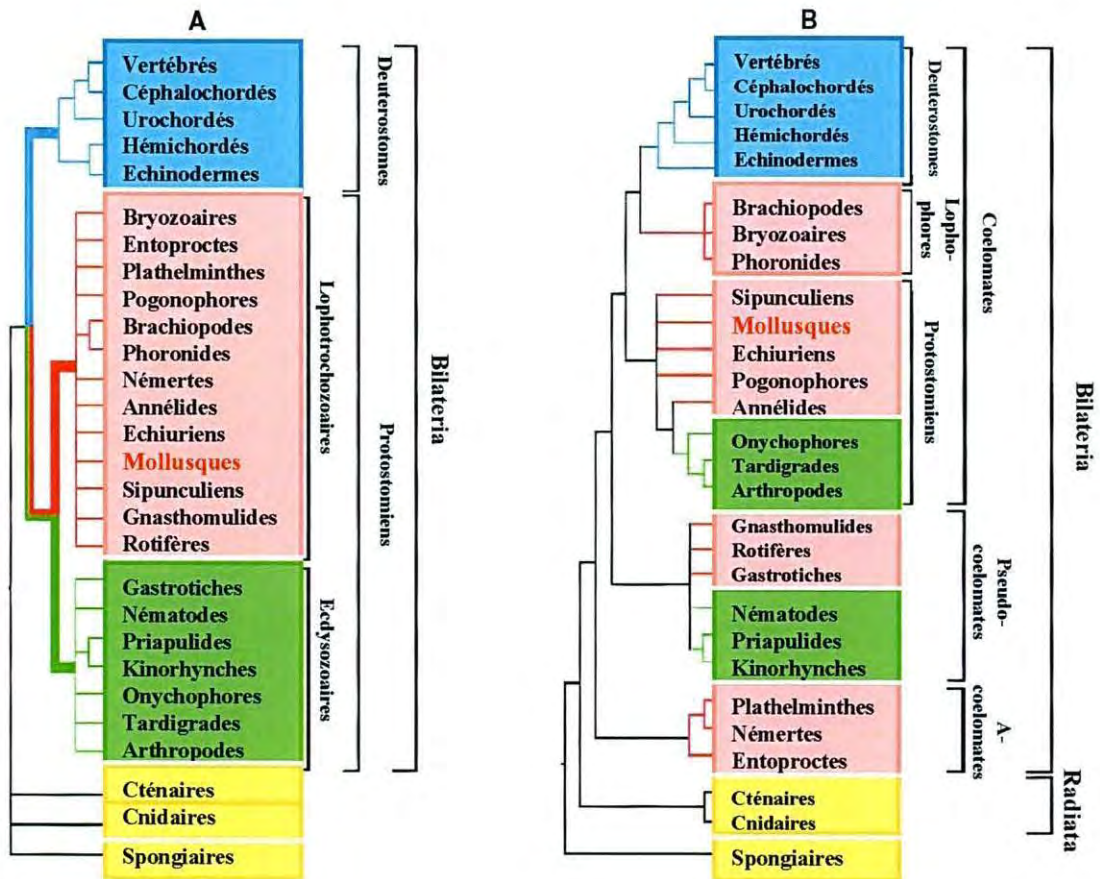
**La première partie** est consacrée à une revue bibliographique sur les connaissances acquises du modèle d'étude, l'huître creuse *C. gigas*. Un premier point est consacré à une brève présentation de la biologie du développement. Dans un second point, nous décrivons les principaux mécanismes cellulaires et les différents effecteurs immunitaires qui contribuent aux défenses de l'huître adulte. Une revue des principales maladies infectieuses et des moyens de lutte contre ces maladies est également présentée. Enfin, nous présentons des rappels sur les connaissances acquises sur l'ontogenèse.

**La seconde partie** concerne la présentation de nos résultats (sous la forme de publications) et font l'objet de trois chapitres:

- Etude au cours de l'ontogenèse de l'expression de gènes potentiellement impliqués dans l'immunité chez l'adulte.
- Identification de gènes différenciellement exprimés au cours de l'ontogenèse par une approche de construction de banques soustractives.
- Caractérisation et étude de l'expression de *Cg-MyD88*, une protéine adaptatrice de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B chez les mammifères, avec un rôle potentiel dans l'immunité innée.

**PREMIERE PARTIE**

**RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**



**Figure 1:** Phylogénies des métazoaires. A: Phylogénie moléculaire, basée sur l'analyse de l'ARNr 18S (Adoutte et al., 2000). B: Phylogénie traditionnelle basée sur la morphologie et embryologie, adaptée de Hyman (1940).

## **I. Modèle d'étude, l'huître creuse *Crassostrea gigas***

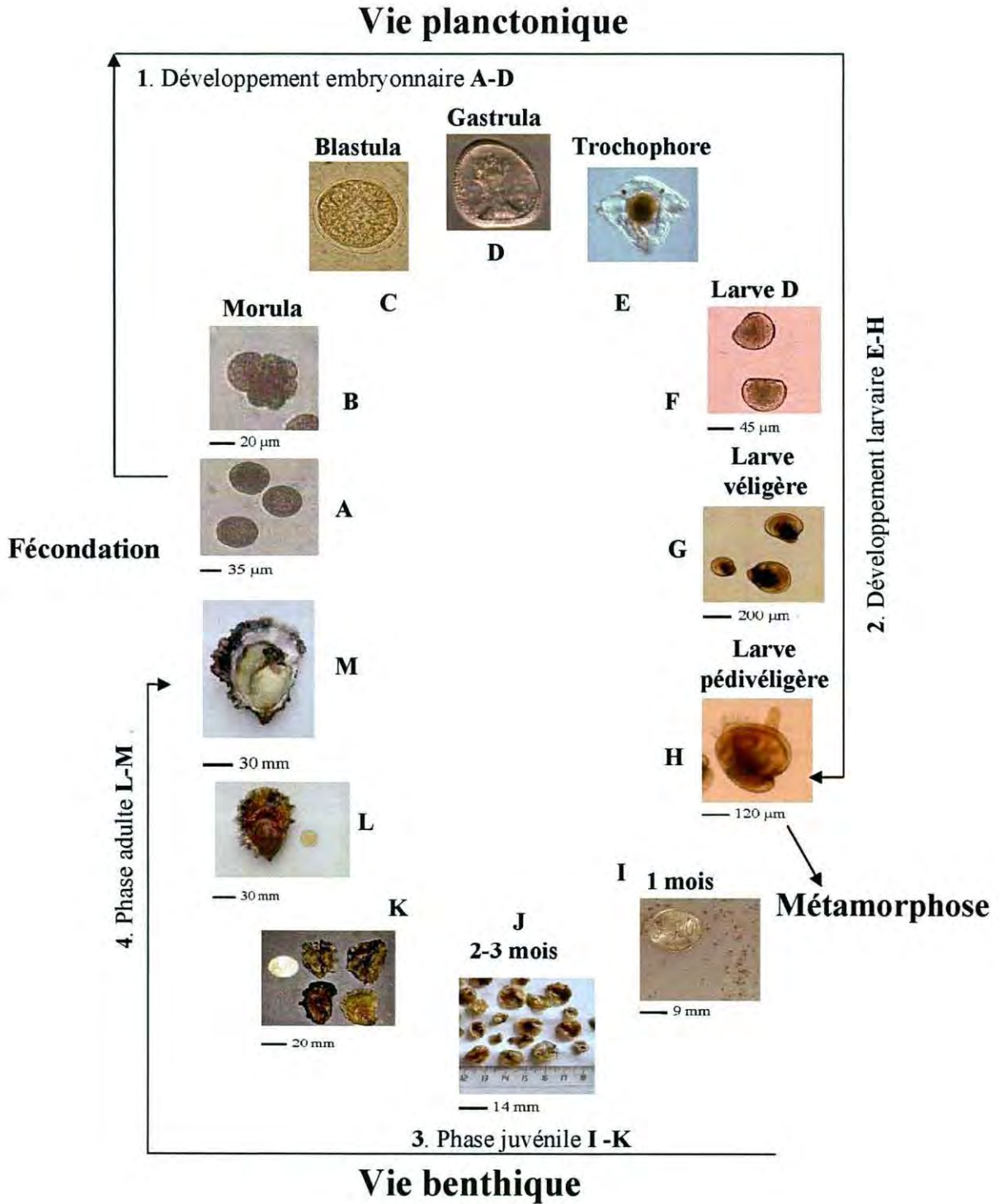
L'huître creuse *Crassostrea gigas* est originaire d'Asie. Elle a été introduite au cours du XX<sup>ème</sup> siècle sur les côtes des continents américain, océanien et européen. Elle a été importée volontairement en France en 1967 pour pallier la disparition de l'huître *C. angulata* due à une virose (Grizel et Héral, 1991).

### **I. 1. Position Phylogénétique**

L'huître *C. gigas* appartient au groupe des Protostomiens Lophotrochozoaires. Ce groupe a été décrit suite à des études phylogénétiques récentes, basées sur l'analyse de la séquence de l'ARNr 18S (Adoutte et al., 1999, 2000), des gènes *Hox* (De Rosa et al., 1999) ou de diverses protéines telles que aldolase, triosephosphate isomérase, phosphofructokinase, méthionine adenosyltransférase, élancement facteur 1- $\alpha$ , ATP synthase  $\beta$  chain, et catalase (Peterson et al., 2004). Ces études ont permis de distinguer trois grands clades dans les Bilatériens (**Figure 1A**), dû probablement à une double divergence survenue à la fin de la période précambrien, il y a 560 à 570 millions d'années (Conway Morris, 2000). La première divergence aurait conduit à la séparation des Deutérostomiens et des Protostomiens et la seconde à la subdivision du groupe des Protostomiens en Lophotrochozoaires et Ecdysozoaires (**Figure 1A**). Cette phylogénie moléculaire a permis de rapprocher les Lophophores des Mollusques et des Annélides. Ces deux embranchements présentent la caractéristique commune de passer par un stade larvaire de type trochophore (Adoutte et al., 2000), et sont classés dans les Protostomiens dans la phylogénie traditionnelle qui est basée sur la morphologie et l'embryologie (**Figure 1B**).

### **I. 2. Systématique**

L'huître creuse *C. gigas* appartient à l'embranchement des *Mollusques*, classe des *Lamellibranches (Bivalvia)*, ordre des *Filibranchia*, sous-ordre des *Anisomyaria*, superfamille des *Ostreoidae*, famille des *Ostreidae*, genre *Crassostrea* et espèce *gigas*, selon les critères taxonomiques de Grassé (1960). Pour l'identification taxonomique des huîtres, les caractères morphologiques de la coquille sont utilisés, alors que la grande plasticité morphologique des coquilles peut facilement porter à confusion. Malgré cela, Ranson (1948) a distingué dans la famille *Ostreidae* trois genres *Crassostrea*, *Ostrea* et *Pycnodonta*, d'après les caractéristiques de la prodissoconche (coquille larvaire). Au sein même du genre *Crassostrea*, existent de nombreuses espèces, elles sont largement répandues sur les côtes d'Asie (*C. gigas*, *C. ariakensis*, *C. sikame*), d'Afrique (*C. gasar*, *C. margaritacea*), d'Amérique (*C. virginica*, *C. rhizophorae*) et d'Europe (*C. angulata*).



**Figure 2: Cycle de vie de l'huître creuse.** A Fécondation: ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs ou réfringents). B-Embryon stade morula (2 heures). C-Embryon stade blastula (3 heures). D-Embryon stade gastrula (6 heures). E-Larve trochophore (12 heures). F-Larves D (24 heures). G-Larves véligères (14 jours). H-Larve pédivéligère (18 jours). I-Naissains post-fixation (1 mois). J-Naissains (2 mois). K-Naissains (6 mois). L-Adulte (10 mois). M-Géiteur mature (10 mois). *Nb : l'âge indiqué pour les photos J-M est représentatif d'huîtres élevées en nurserie et en claire ostréicole.* Modifié d'après Dégremont, 2003.

### I. 3. Cycle de vie de l'huître creuse *C. gigas*

Au cours de son cycle de vie l'huître a deux modes de vie (**Figure 2**). Les stades embryonnaires et les stades larvaires ont un mode de vie planctonique, tandis que les adultes, qui ont un mode de vie benthique, adhèrent majoritairement aux substrats durs au niveau des zones littorales.

*C. gigas* est une espèce hermaphrodite alternative, les adultes changent de sexe au cours de leur vie, avec une tendance à la protandrie c'est à dire avec un premier cycle de reproduction en tant que mâle (Héral et Deslous-Paoli, 1990). La fécondation est externe et a lieu dans l'eau après l'émission des gamètes mâles et femelles en dehors de la coquille. La fécondation déclenche la fin de la maturation des ovocytes. En effet, chez l'huître les gamètes femelles restent au stade d'ovocyte de 1er ordre (diploïde) jusqu'à la ponte, stade métaphasique de la méiose (Lessman, 1999; Picton et Gosden, 1999).

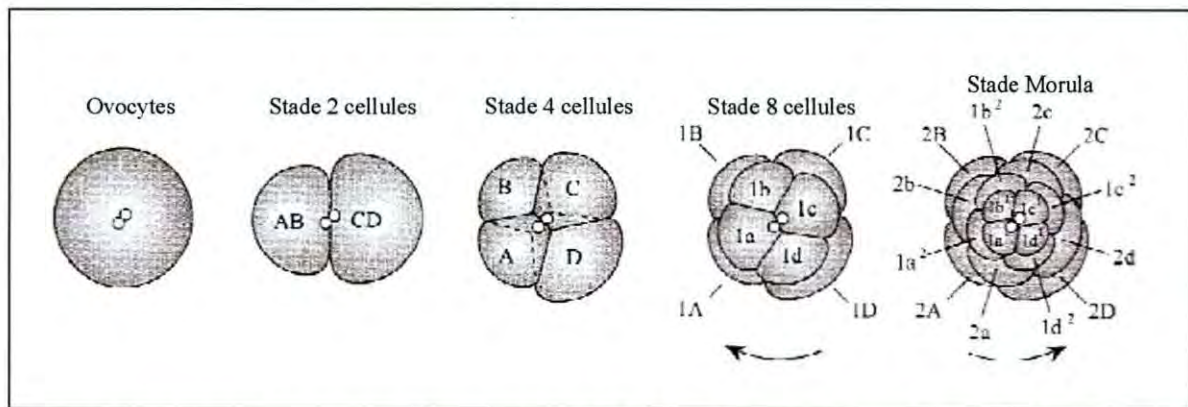
Le cycle de vie de l'huître est divisé en 4 étapes, (1) développement embryonnaire, (2) développement larvaire, (3) phase juvénile, (4) phase adulte (**Figure 2**).

#### I. 3. 1. Développement embryonnaire

Le développement embryonnaire chez les mollusques bivalves repose sur des divisions cellulaires ou segmentations rapides de l'œuf. La première étape du développement embryonnaire est le clivage de l'œuf, qui chez la plupart des protostomiens lophotrochozoaires est de type spiral (Furuya et al., 1996; Young et al., 1996; Boyer et Henry, 1998).

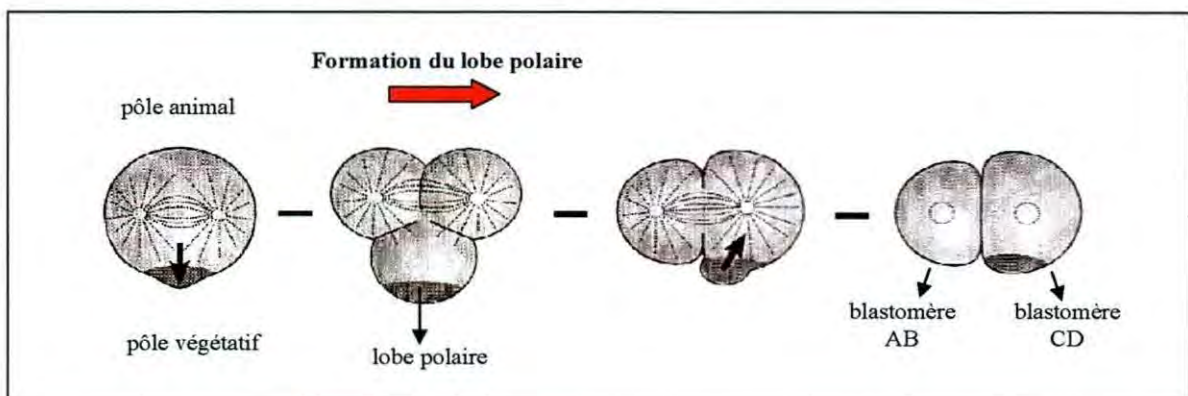
Le modèle de clivage spiral illustré dans la **Figure 3** montre un des modèles le plus conservé de l'embryogenèse précoce (Lillie, 1895, Sterrer, 1974; Costello et Henley, 1976; Bakke, 1990; Furuya et al., 1996; Young et al., 1996; Boyer et Henry, 1998). La division des cellules est si régulière qu'une nomenclature spécifique a été développée pour indiquer les différentes cellules dans les embryons (Conklin, 1897). Brièvement, les deux premiers plans de clivage sont longitudinaux, définissant ainsi la division des deux premières cellules désignées sous le nom de blastomères AB et CD (stade 2 cellules, où le blastomère CD étant le plus grand). La seconde division est inégale et perpendiculaire à la première, formant le premier quadrant de blastomères: A, B, C et D (stade 4 cellules) où le quadrant D est distingué par sa plus grande taille. Le troisième plan de clivage est transversal et légèrement au dessus de l'équateur (stade 8 cellules). Il forme le premier carré de micromères (1a, 1b, 1c, 1d) au pôle animal, par opposition au pôle végétatif constitué du carré de macromères (1A, 1B, 1C, 1D).





**Figure 3 :** Modèle de segmentation de l'œuf chez les *Protostomiens*. Clivage de type spiral inégal, lors des trois premières divisions de l'œuf (Henry et Martindale, 1999).

Par ailleurs, une autre caractéristique du développement embryonnaire consiste en la formation du lobe polaire (**Figure 4**). Il s'agit d'une protubérance cytoplasmique qui apparaît au pôle végétatif de l'œuf avant la formation du premier sillon de segmentation et qui est réintégrée dans le blastomère CD au stade deux cellules. Ce phénomène se répète au stade suivant mais avec une moindre ampleur. Au stade 4 cellules, la réintégration du lobe polaire détermine que le blastomère D est impliqué dans la formation du mésoderme. Il a été démontré que le lobe polaire contient des déterminants cytoplasmiques nécessaires au rythme du clivage, à la spécification de l'axe dorso-ventral et à la différenciation du mésoderme (Verdonk et van den Biggelaar, 1983; Henry, 1986).

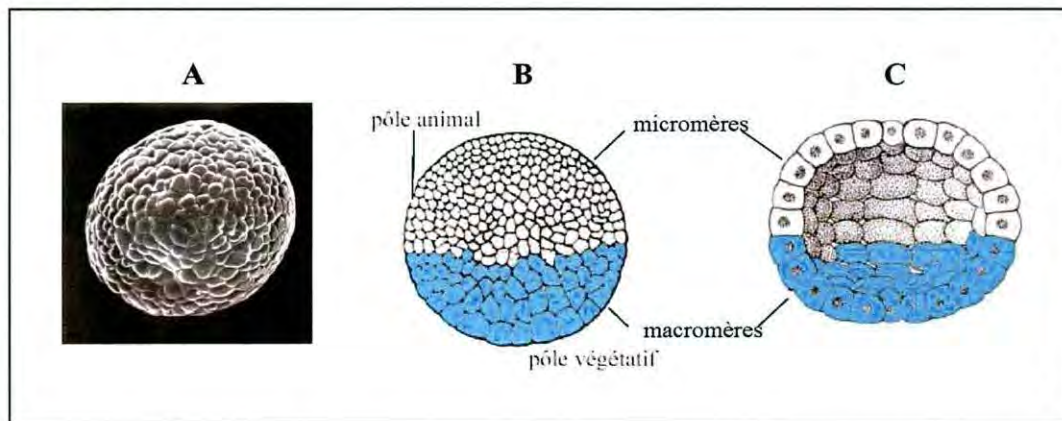


**Figure 4 :** Première segmentation de l'œuf chez les *Protostomiens*, avec un type de clivage spiral inégal et formation du lobe polaire. (Henry et Martindale, 1999).

Ce type de segmentation spiral aboutit à la formation du stade morula, suivi par le stade blastula et finalement le stade gastrula qui correspond au dernier stade du développement embryonnaire.

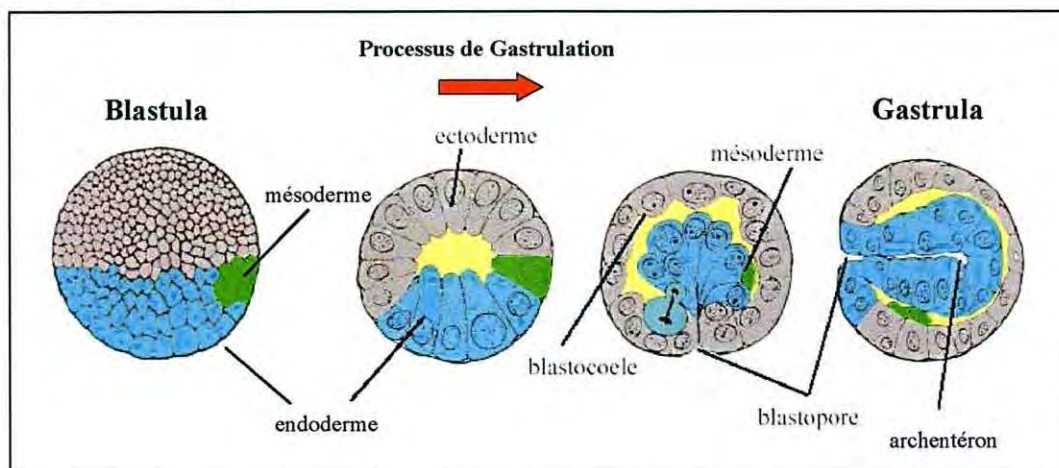
Les divisions cellulaires de l'œuf chez l'huître creuse aboutissent à la formation d'un embryon de type **Morula** (16 cellules) 2-3 heures post fécondation (**Figure 3**) (Mouëza et al., 1999).

Le premier stade mobile est la **Blastula** de type stéréoblastula (**Figure 5**), c'est à dire que la division des micromères (pôle animal) est plus rapide que celle des macromères (pôle végétatif), conduisant à envelopper le pôle végétatif. L'apparition de plusieurs cils sans une distribution précise sur les embryons est une caractéristique typique de ce stade (Moor, 1983; Mouëza et al., 1999).



**Figure 5:** Stéréoblastula. A. Photographie d'une stéréoblastula, B. Schématisation d'une stéréoblastula avec le pôle animal et végétatif (stade 128 cellules), C. Coupe sagittale d'une stéréoblastula indiquant les micromères et les macromères.

Le dernier stade embryonnaire est la **Gastrula** (**Figure 6**). La gastrulation se fait par épibolie, les cellules du pôle animal qui formeront l'ectoderme se divisent jusqu'à recouvrir totalement les cellules du pôle végétatif qui formera l'endoderme. Un processus d'invagination se produit, formant le blastopore, lequel permet le contact de l'endoderme avec l'extérieur (Moor, 1983).



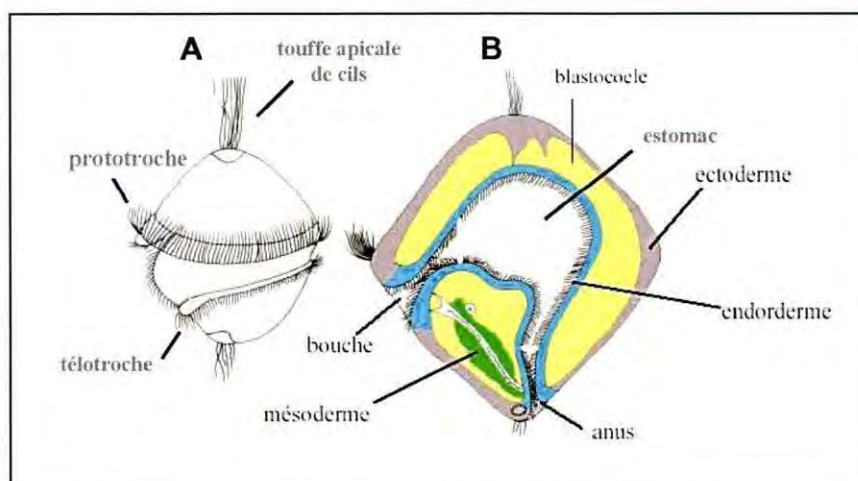
**Figure 6:** Schémas du processus de gastrulation et formation des feuilletts blastodermiques.

I. 3. 2. Développement larvaire et métamorphose

**Développement larvaire**

La taille et la durée de développement des stades larvaires dépendent de plusieurs facteurs environnementaux, essentiellement l’approvisionnement alimentaire et la température (Waller, 1981). Pendant le développement larvaire, différents stades peuvent être reconnus: larve trochophore, larve D, larve véligère et larve pédivéligère.

**La larve trochophore (Figure 7)** apparaît 12h après la fécondation et a une forme de toupie non segmentée qui est une caractéristique des larves des Lophotrochozoaires (Annélides, Mollusques). Dans cette larve, l'ectoderme forme la paroi externe du corps, il porte des cils qui interviennent dans la locomotion. Ces cils sont disposés sur 2 couronnes: la prototroche autour de la bouche qui formera le velum et le télotroche autour de l’anus localisé en arrière du blastopore. Il y a également une touffe apicale de cils qui constitue l’organe sensoriel. Le battement des cils permet d'orienter le déplacement de la larve et joue le rôle de gouvernail. L'endoderme donne le tube digestif qui s'ouvre par la bouche juste au-dessous du prototroche et l'anus qui est postérieur et terminal. Le mésoderme est le troisième feuillet qui est formé durant l’embryogenèse précoce entre la membrane basale de l’ectoderme et l’endoderme. Ce mésoderme va par la suite se différencier en organes et tissus.



**Figure 7:** Schématisation d’une larve trochophore, A. Vue latérale et B. Vue sagittale.

La larve trochophore pélagique endotrophe vit dans les eaux de surface et commence une transformation progressive pour atteindre la forme de larve «D» (60  $\mu\text{m}$ ). La larve «D» (prodissoconche I) (Figure 8) est obtenue 24 heures après la fécondation à 23°C. Elle a une forme particulière, caractérisée par une charnière droite qui ressemble à un D, laquelle correspond à la future coquille de l'huître. A ce stade, apparaît le vélum qui possède des cils. Le vélum est l'organe de nutrition et de locomotion.



Figure 8 : Larve D



Figure 9 : Larve véligère

La larve véligère (prodissoconche II) (Figure 9) d'une hauteur de 100 à 250  $\mu\text{m}$ , est obtenue 48 heures après la fécondation à 23°C. Le vélum est complètement formé, d'où le nom de véligère. La charnière devient bombée entre le deuxième et le cinquième jour et l'umbo devient de plus en plus proéminent avec l'augmentation de la taille. A ce stade la coquille larvaire est beaucoup plus calcifiée.

La larve pédivéligère (Figure 10), d'une hauteur > 250  $\mu\text{m}$ , apparaît après une vingtaine de jours de vie pélagique. Elle est caractérisée par la présence simultanée d'un pied, du vélum et de la tâche oculaire. Après fixation à un support solide, la larve débute sa métamorphose entraînant de nombreux remaniements, tels que la disparition du pied et du vélum et l'apparition des branchies.

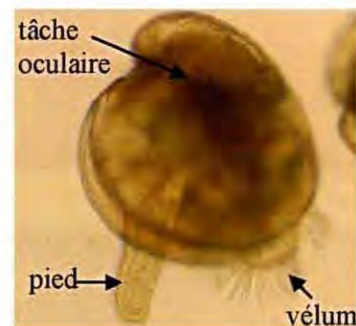


Figure 10 : Larve pédivéligère

### ***Anatomie des larves au cours du développement avant la métamorphose.***

Les larves des huîtres contiennent des organes spécialisés, non présents chez les adultes, qui sont adaptés au style de vie pélagique et à la nécessité de se fixer à un support solide à la métamorphose (Elston, 1980; Elston et Leibovitz, 1980; Elston, 1999). Afin d'avoir une meilleure compréhension de l'anatomie des larves d'huîtres, les tissus ont été groupés en six systèmes fonctionnels selon leur ordre d'apparition au cours du développement: (1) le vélum et le manteau, (2) le système digestif, (3) les muscles, (4) les cellules libres de la cavité viscérale, (5) le pied, (6) les organes rudimentaires (branchie, système vasculaire, excréteur et nerveux).

- **Le vélum**, qui est présent dès 24 heures après la fécondation et disparaît après la métamorphose, est considéré comme l'organe de nutrition et de locomotion chez les larves d'huître. Il est formé d'une bande ciliaire qui est composé d'épithélium colonnaire spécialisé (Elston, 1980).

- **Le manteau**, qui apparaît au stade larve D, reste présent chez l'huître adulte. La surface interne de chacune des deux valves de la coquille est tapissée d'un épithélium qui se replie sur ses bords et forme trois lobes (Elston, 1980). Il est impliqué dans la première barrière de défense contre l'invasion des pathogènes (Herpin et al., 2005).

- **Le système digestif**, qui se développe dès les premiers stades larvaires est composé de *i*) la bouche, située en face postérieure du vélum, *ii*) l'œsophage cilié cylindrique, *iii*) l'estomac cilié lui aussi, qui fini par un stylet cristallin, *iv*) la glande digestive, un organe simple en forme de H, *v*) et l'intestin. Les organes du système digestif sont généralement structurés par une simple couche d'épithélium stratifié. Ces organes ont un rôle primordial dans la nutrition des larves sachant que celles-ci commencent à se nourrir dès 24 heures après la fécondation.

- **Les muscles** apparaissent pendant le développement de la larve D. On distingue les muscles rétracteurs et les muscles adducteurs. Les multiples muscles rétracteurs, du vélum, du pied et de la zone de la bouche, aident à la prolongation et la rétraction de ces organes en cas de stimuli. Les muscles adducteurs contrôlent, comme chez l'adulte, l'ouverture et la fermeture de la coquille. Pendant la métamorphose, le muscle adducteur antérieur et les muscles rétracteurs sont dégénérés et le muscle adducteur postérieur est nettement agrandi.

- Deux types de **cellules libres** dans la cavité viscérale ont été décrits par Elston, 1980 et Elston et Leibovitz, 1980 dans les stades larve D et larve véligère. Un premier type de cellules correspondant à des cellules phagocytaires avec des granules intra-cytoplasmiques, similaires aux hémocytes granuleux des huîtres adultes, sont attachées à la surface de la cavité viscérale. Le second type est décrit comme des cellules non phagocytaires cuboïdes, relativement grandes qui contiennent un réticulum endoplasmique lisse abondant et sont observées plus particulièrement dans la région de l'umbo de la cavité viscérale.

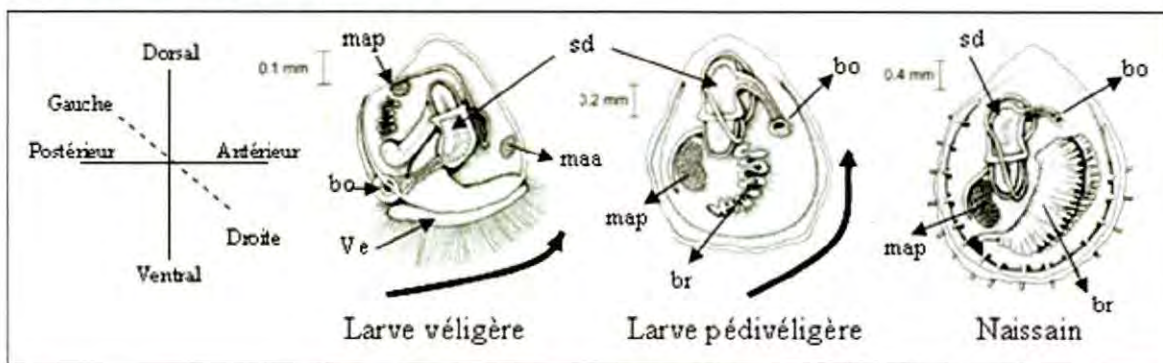
- **Le pied**, décrit par Stafford (1905), apparaît comme un épaissement dans la membrane postérieure de la cavité viscérale, augmentant sa taille et sa complexité tout au long de la période larvaire. Le pied permet la fixation de la larve à un substrat solide juste avant la métamorphose à partir de laquelle le pied disparaît.

- **Les organes rudimentaires**. Les branchies constituent le tissu le moins développé pendant l'ontogenèse. Elles se développent à la fin du stade de larve pédivéligère. Les branchies sont composées d'un tissu indifférencié et apparaissent latéralement en tant que plis

de tissu à partir de chaque lobe de manteau (Elston, 1980). Chez l'adulte, elles sont le site de l'absorption de l'oxygène, et constituent le principal organe de la respiration et servent à la filtration et à la rétention des particules en suspension (Bougrier et al., 1995; Gouletquer et al., 1999). Le système circulatoire qui est rudimentaire au cours du développement, est de type lacunaire ou semi-ouvert chez l'adulte, en contact constant avec le milieu extérieur. Il est composé de vaisseaux et de sinus. L'hémolymphe ou sang de l'huître dans lequel se trouvent les hémocytes, circule aussi bien dans les vaisseaux et le cœur que dans les autres tissus de l'animal. Ces derniers éléments jouent un rôle primordial dans les mécanismes de défense chez l'huître.

### **Métamorphose**

La fin de la vie pélagique de l'huître, soit environ 22 jours après la fécondation, se caractérise par la fixation de la larve à un support solide. Suite à cette fixation deux processus physiologiques distincts mais complémentaires sont observés. Le premier concerne l'histolyse qui va conduire à la résorption des organes larvaires tels que le pied, les yeux et le velum, via l'activation des lysosomes et l'action des phagocytes (Burke, 1983). Le second processus fait appel à une différenciation d'organes déjà présents aux stades larvaires, ainsi qu'à une réorganisation tissulaire (**Figure 11**).



**Figure 11:** Schéma de la localisation et de la réorientation des différents organes pendant la métamorphose. La bouche (bo) est déplacée d'une position postéroventrale dans la larve véligère à une position antérodorsale chez le naissain. Dans la larve pédivéligère, le muscle adducteur postérieur (map), les branchies (br) et le système digestif (sd) tournent dans un sens anti-horaire, comme indiqué par les flèches. Vélum (Ve), muscle adducteur antérieur (maa).

**Le stade de naissain** commence quand la réorganisation tissulaire est complète et tous les organes sont dans la position adulte. À ce stade, les organes n'ont pas atteint leur complexité comme chez l'adulte, celle-ci est définitive quand la taille de la coquille est d'environ 1-2 centimètres (Elston, 1999) et le naissain ne fait que croître pour atteindre la taille adulte.

## II. Système immunitaire chez l'huître adulte

### II. 1. Généralités

Les huîtres comme les autres invertébrés sont dépourvues d'immunité acquise liée à des cellules mémoire qui conduisent chez les vertébrés à la production d'anticorps ou immunoglobulines lors d'infection. Chez l'huître, les mécanismes de défense reposent sur l'immunité innée. Les barrières anatomiques et chimiques constituent la première ligne de défense empêchant les dommages aux tissus, les pertes de fluides et l'invasion par des microorganismes. Cette première ligne de défense est principalement assurée par la coquille, le manteau, les branchies et le mucus (Glinski et Jarosz, 1997, Herpin et al., 2005). La seconde ligne de défense met en jeu les composants de l'hémolymphe (Canesi et al., 2002) dans laquelle sont trouvés les hémocytes circulants qui constituent les éléments clé de la réponse immunitaire et sont parfois infiltrées dans les tissus (Xue et Renault, 2001, Bachère et al., 2004). Ces cellules sont impliquées dans des réactions cellulaires telles que la phagocytose, l'encapsulation, la nécrose et la liquéfaction de tissus (Prieur et al., 1990; Chagot et al., 1992; Fryer et Bayne, 1996; Leclerc, 1996). De plus, les hémocytes contribuent à la production de nombreux effecteurs moléculaires tels que des lectines, des enzymes lysosomales, des protéases et des inhibiteurs de protéases et divers peptides anti-microbiens. Ces effecteurs sont stockés dans les granules des cellules ou sécrétés dans le plasma (Prieur et al., 1990; Leclerc, 1996; Bachère et al., 2004).

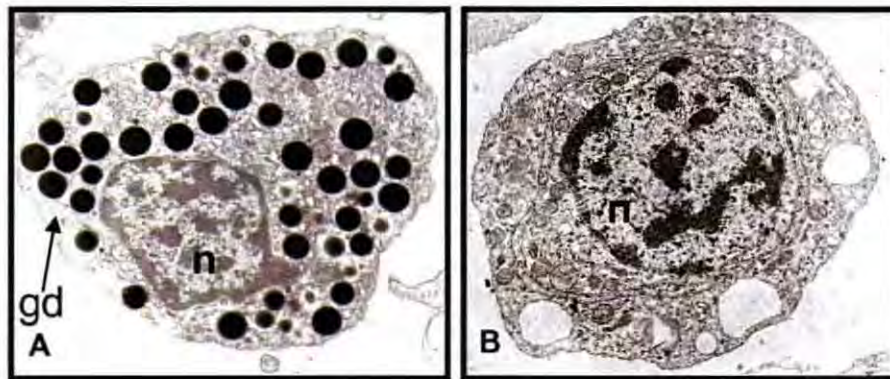
### II. 2. Les hémocytes

#### II. 2. 1. Types hémocytaires et hématopoïèse

Les premiers travaux relatifs à la classification des hémocytes des bivalves ont été réalisés sur l'espèce *C. gigas* par Tanaka et al., (1961). Six types de cellules ont été identifiés sur la base d'observations de critères morphologiques, forme et taille des cellules et du noyau, position et intensité de coloration du noyau, distribution de la chromatine, et nature des granules cytoplasmiques. Par ailleurs, des critères cytochimiques et fonctionnels, ont été utilisés pour identifier et classer les types hémocytaires décrits en détail par Cheng (1981, 1996). A ce jour, aucune classification ne semble satisfaisante, mais en général, on considère l'existence de deux grands types cellulaires (**Figure 12**), **les granulocytes** qui possèdent des granules cytoplasmiques, un rapport nucléocytoplasmique faible et une activité phagocytaire (Cheng, 1981; Bachère et al., 1988) et **les hyalinocytes** qui sont caractérisés par l'absence de granule cytoplasmique et un rapport nucléocytoplasmique élevé (Cheng, 1981; Bachère et al., 1988). Cependant, tous les stades morphologiques intermédiaires peuvent être observés. Par

ailleurs, la cytométrie de flux, prenant en compte des critères de taille et de complexité des cellules, a été utilisée pour différencier les populations hématocytaires chez l'huître (Fisher et Ford, 1988, Allam et al., 2002, Goedken et De Guise, 2004). Ces travaux supportent l'existence de 2 populations distinctes, les hyalinocytes et les granulocytes, et d'un groupe intermédiaire de cellules qui sont caractérisées par une grande taille et par la présence de peu de granules (Allam et al., 2002).

Chez l'huître, aucun site d'hématopoïèse n'a encore été identifié à ce jour, et les phénomènes de prolifération et de lignage hématocytaire sont méconnus. Certains auteurs suggèrent l'existence d'un organe hématopoïétique spécifique alors que d'autres considèrent que le tractus digestif pourrait jouer ce rôle (Cheng, 1981) mais en général, bien que non démontré, il est admis que les hématocytes peuvent provenir des cellules du tissu conjonctif (Cheng, 1981).



**Figure 12** : Types hématocytaires chez *Crassostrea gigas*. A : Granulocytes, à rapport nucléocytoplasmique faible, leur cytoplasme contient de nombreux granules sphériques uniformément denses. B : Hyalinocytes, à rapport nucléocytoplasmique élevé, et cytoplasme sans granule. n. noyau, gd. grains denses. Microscope électronique à transmission x 10800 (Bachère et al., 2004).

## II. 2. 2. Ontogenèse des hématocytes

L'ontogenèse des hématocytes est encore très mal connue et les données sont essentiellement basées sur des évaluations interprétatives (Moore et Lowe, 1977; Cheng, 1981). Mix (1976) a proposé quatre phases au cours de l'ontogenèse des hématocytes (**Figure 13**), sur la base des données décrites par plusieurs auteurs.

- (1) l'étape initiale impliquerait une **prolifération cellulaire** à partir d'une cellule souche appelée « leucoblaste », laquelle se différencierait en hyalinocyte;
- (2) une étape de **maturation des hyalinocytes** pendant laquelle les hyalinocytes se différencieraient en hyalinocytes granuleux et en deux autres types de cellules intermédiaires;



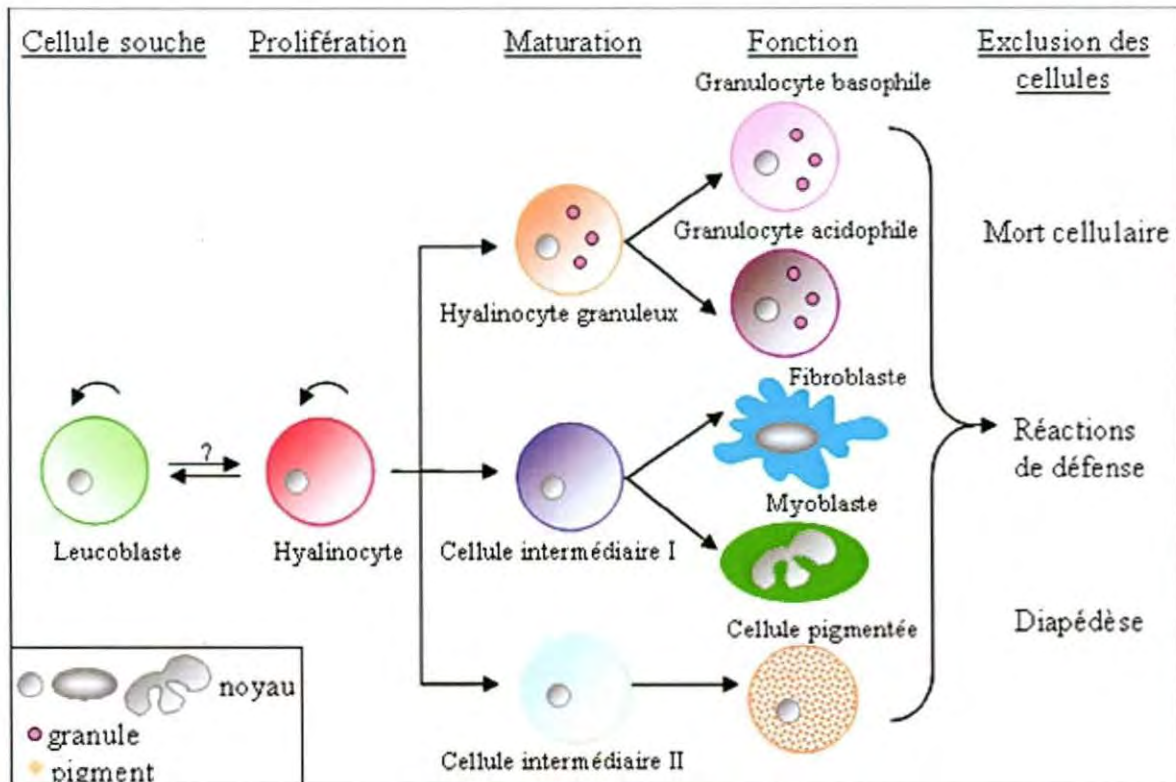


Figure 13: Modèle général de l'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves, proposé par Mix (1976).

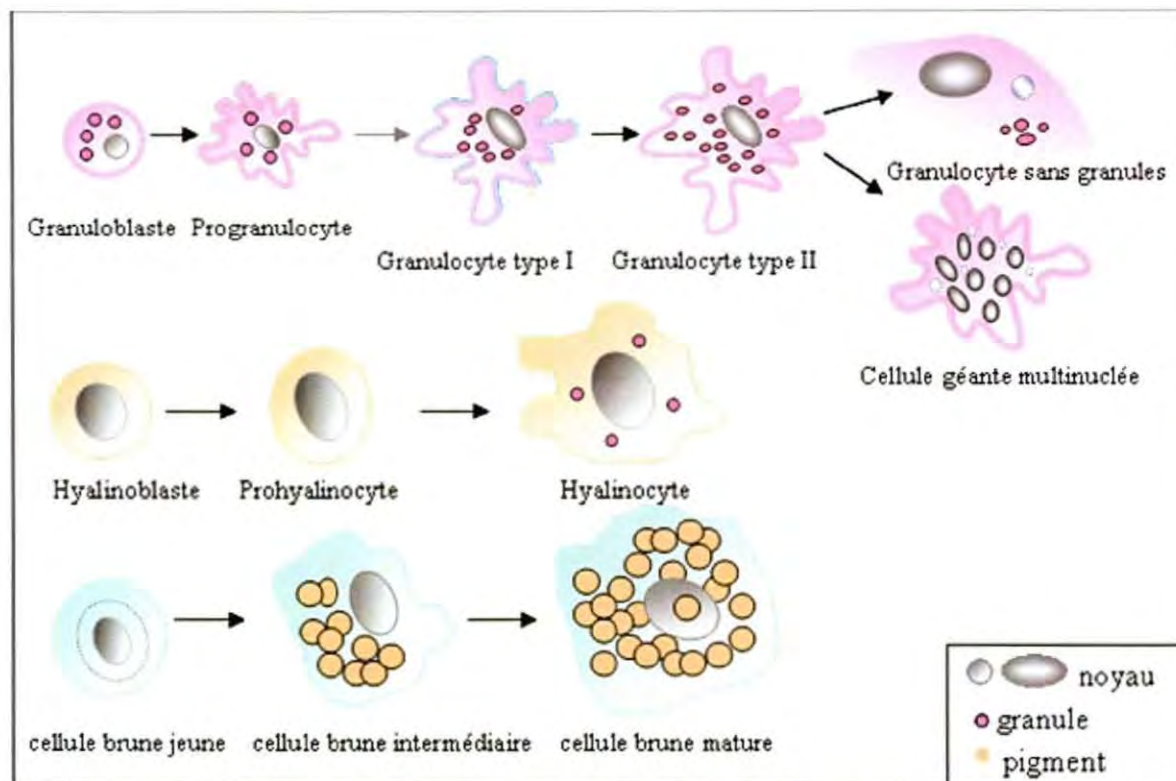


Figure 14: Schéma de synthèse de l'ontogénèse hémocytaire chez les bivalves, proposé par Cheng (1981).

- (3) dans une troisième étape, **la différenciation des hyalinocytes granuleux** conduirait à la formation de granulocytes basophiles et acidophiles, tandis que la différenciation des cellules intermédiaires aboutirait à la formation des fibroblastes, myoblastes et cellules pigmentées;
- (4) la dernière étape, correspondrait à une phase **d'élimination des cellules**. Alors que toutes ces cellules seraient impliquées dans des réactions de défense, seules certaines d'entre elles seraient éliminées par sénescence ou diapédèse.

Cheng (1981, 1983) a proposé un autre modèle de l'ontogenèse des hémocytes chez les bivalves et propose que les hémocytes se formeraient à partir de trois types de cellules souches différentes, les granuloblastes, les hyalinoblastes et les jeunes cellules brunes. Les granulocytes résulteraient de plusieurs étapes de différenciation et de maturation des granuloblastes alors que les hyalinocytes et les cellules brunes impliqueraient seulement deux étapes de maturation (**Figure 14**).

#### II. 2. 3. Fonctions des hémocytes

Les hémocytes jouent un rôle primordial dans la physiologie d'huître. Ils participent à de nombreux processus vitaux comme les réactions de défense, la réparation des lésions, la recalcification de la coquille, le transport de nutriments, la respiration, la digestion et les processus d'excrétion (Sminia et van der Knaap, 1987; Feng, 1988; Cheng, 1996). Les propriétés d'agrégation et d'adhésion des hémocytes sont considérées comme essentielles dans la réparation des lésions. La phase initiale implique une infiltration d'un grand nombre d'hémocytes sur le site de la lésion, qui phagocytent les débris des tissus nécrosés (Cheng 1988). Cette propriété de phagocytose est très utilisée pour éliminer les éléments exogènes (pathogènes, déchets alimentaires, gamètes résiduels) (Fisher, 1986; McCormick-Ray, 1991; Chagot et al., 1992). Ces cellules jouent un rôle de transporteur notamment du calcium et des protéines indispensables sur le site de réparation de la coquille (Cheng, 1981), de nutriments et de molécules de défense (Cheng, 1996). Le rôle des hémocytes dans l'excrétion est relativement peu connu, les hémocytes participeraient à la capture, au stockage et à l'élimination des métaux par un processus d'endocytose (Cheng, 1981).

#### II. 3. Mécanismes de défense à médiation cellulaire

Parmi leurs nombreuses fonctions, les hémocytes jouent un rôle clé dans les défenses en tant que cellules immunocompétentes (Blaise et al., 2002; Canesi et al., 2002; Bachère et al., 2004). Les mécanismes d'implication des hémocytes dans le système de défense sont principalement, l'infiltration, la phagocytose, l'encapsulation et très probablement la prolifération cellulaire.

### II. 3. 1. Infiltration hémocytaire

L'infiltration conduit à une augmentation de densité des hémocytes sur le site de lésion d'un tissu ou d'infection par des pathogènes (Ficher, 1986), le but pouvant être la destruction ou l'isolement de l'organisme étranger, la sécrétion de molécules, la réparation tissulaire, ou bien dans certains cas extrêmes, la destruction du tissu de l'hôte (Feng, 1988; Ford et al., 1993). A ce jour, l'origine des hémocytes infiltrants n'est pas encore clairement établie. Deux hypothèses sont données: (1) la mobilisation des cellules présentes dans d'autres compartiments, (2) la prolifération des hémocytes *in situ* (Ford et al., 1993).

### II. 3. 2. Phagocytose

La phagocytose est la réaction cellulaire de défense la plus importante et la mieux décrite (Chagot et al., 1992, Mourton et al., 1992; Xue et al., 2001; Lambert et al., 2003; Goedken et De Guise, 2004). Elle contribue à l'élimination de corps étrangers de petite taille. Différents travaux ont été réalisés pour déterminer si la phagocytose était liée à un type cellulaire particulier (Chagot, 1989; Hervio, 1992; Hine, 1999; Goedken et De Guise, 2004). En effet, parmi les différents types d'hémocytes, les granulocytes présentent la plus forte activité phagocytaire. Les cellules brunes participent également au phénomène sur les sites de lésions et d'infections (Hine, 1999). La phagocytose est un processus universel existant tant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Elle se déroule en plusieurs étapes, la reconnaissance et la fixation du « non-soi » sur l'hémocyte, la formation de pseudopodes, l'internalisation dans le phagosome et enfin la dégradation intracellulaire de l'élément phagocyté (Cheng, 1983; Chagot, 1989; Chagot et al., 1992).

#### II. 3. 2. 1. Reconnaissance et fixation du non-soi sur l'hémocyte

Les mécanismes de reconnaissance du non-soi sont une étape primordiale pour la mise en œuvre de réactions de l'immunité et l'élimination des particules étrangères. Deux processus de déclenchement sont possibles, soit une rencontre aléatoire, soit l'activation du chimiotactisme dans les hémocytes (Olafsen et al., 1992). La fixation entre l'hémocyte et la particule étrangère repose sur la présence de molécules de reconnaissance qui peuvent être circulantes, se présenter sous forme solubles dans l'hémolymphe, où se localiser dans les hémocytes au niveau des granules où associées aux membranes, capables de reconnaître des composants des polysaccharides présents à la surface des microorganismes. Parmi ces composants, il faut citer les lipopolysaccharides (LPS) constituant la paroi des bactéries à Gram (-) ou les  $\beta$ -1,3-glucanes de la paroi des champignons, l'acide lipotéichoïque, des lipoarabinomannanes, des lipopeptides ou l'ADN bactérien (Beutler, 2004). Sur le plan

structural, les LPS sont constitués d'un lipide A et d'une partie polysaccharidique débordant de la membrane externe des bactéries.

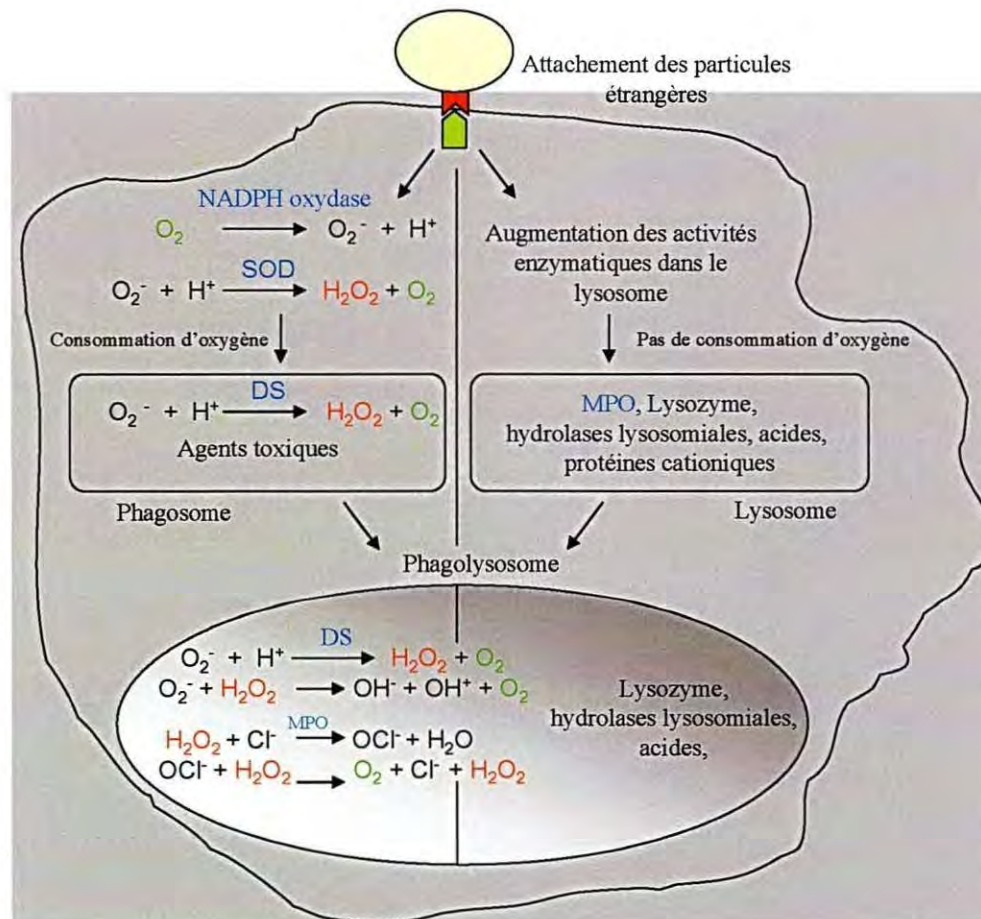
Chez l'huître, deux protéines plasmatiques capables de se lier aux LPS ont été caractérisées, *Cg-LBP* (*C. gigas* LPS Binding Protein) et *Cg-EcSOD* (*C. gigas* Extracellular Superoxide Dismutase) (Gonzalez, 2005; Gonzalez et al., 2005). Expérimentalement les auteurs ont déterminé que *Cg-LBP* montre des affinités plus forte pour les LPS que pour le lipide A qui sont comparables aux affinités observées pour des LBP chez d'autres espèces (Tan et al., 2000). La séquence en acides aminés de *Cg-EcSOD* présente deux motifs: un motif DDED qui est connu chez les vertébrés pour être impliqué dans la liaison aux LPS via le récepteur CD14 (Shapiro et al., 1997) et un motif RGD (Arg-Gly-Asp) impliqué dans l'association avec des protéines cellulaires de type intégrines intervenant dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Sonnenberg, 1993). Une autre protéine, *Cg-BPI* (*C. gigas* Bactericidal/Permeability Increasing protein) a été caractérisée chez l'huître, cette protéine est homologue à BPI produite dans les granules de neutrophiles chez les vertébrés (Weiss et al. 1978). *Cg-BPI* a montré la présence de motifs ou régions conservés intervenant dans la reconnaissance et la liaison aux LPS (Gonzalez, 2005). De plus, le lysozyme contenu également dans les granules des neutrophiles chez les vertébrés, a été caractérisé pour sa capacité de liaison aux LPS (Ohno et Morrison, 1989). Dans un premier temps, il se lie par une interaction électrostatique au groupe phosphate du lipide A qui est suivi par une interaction hydrophobe (Brandenburg et al., 1998). En utilisant une approche de génomique fonctionnelle, des protéines de reconnaissance tels que la «  $\beta$ -1,3-glucan binding protein » ont été identifiées (Boutet et al., 2004; Tanguy et al., 2004). Enfin, des lectines qui sont des glycoprotéines capables de se lier aux composés hydrates de carbone de différents microorganismes ont été mises en évidence (Olafsen et al., 1992; Gueguen et al., 2003).

#### II. 3. 2. 2. Dégradation intracellulaire

La particule étrangère est finalement détruite soit par des enzymes lysosomales qui sont des enzymes hydrolytiques accumulées dans les lysosomes (Cheng, 1983), soit par une forte réaction oxydative consistant en la production de formes intermédiaires réactives d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène (**Figure 15**) (Chagot et al., 1992; Lambert et al., 2003). Les produits de dégradation de la particule étrangère sont soit utilisés par la cellule après accumulation dans des vacuoles sous forme de pigment ou soit libérés dans le milieu extracellulaire sous forme de vésicules (Feng, 1988; Xue, 1998).

La production de radicaux libres de l'oxygène est initiée lors du processus phagocytaire par l'attachement de particules étrangères à la surface de la membrane cytoplasmique des

hémocytes (**Figure 15**). Les radicaux oxygénés ou ROS (Reactive Oxygen Species) regroupent  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{OCl}^\cdot$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces ROS, ont de forts pouvoirs microbicides et sont impliqués dans la destruction microbienne par des effets toxiques (Babior, 1984; Beutler, 2004). Ces radicaux libres se retrouvent dans le phagosome fusionné avec les lysosomes. Après cette fusion, ces radicaux peuvent réagir avec d'autres molécules pour former des substances encore plus toxiques. Par exemple dans les lysosomes, la présence de myéloperoxydase produit de l'hypochlorite à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions chlorures. La production de ROS a été mise en évidence chez plusieurs espèces de bivalves comme chez l'huître américaine *C. virginica* (Anderson et al., 1992; Bramble et Anderson, 1997), l'huître creuse *C. gigas* (Bachère et al., 1991; Lambert et al., 2003; Labreuche et al., 2006), et l'huître plate *O. edulis* (Chagot, 1989; Bachère et al., 1991).



**Figure 15** : Représentation des processus de dégradation intracellulaire intervenant après phagocytose d'une particule étrangère par les hémocytes. NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase), SOD (Superoxyde Dismutase), DS (Dismutase Spontanée), MPO (Myéloperoxydase).

### II. 3. 3. Encapsulation

L'encapsulation correspond à une accumulation d'hémocytes organisés en couches successives autour de corps étrangers comme les parasites multicellulaires (trématodes, cestodes) lorsque ceux-ci sont trop grands pour être phagocytés par les cellules de l'hôte (Ratcliffe et al., 1985). Ce processus est suivi par la libération de produits cytotoxiques, tels que des enzymes dégradantes et des radicaux libres, afin de détruire l'envahisseur. Alors que la reconnaissance serait réalisée par les hémocytes, l'encapsulation et la réponse cytotoxique semblent être en partie régulée par des facteurs humoraux (Bayne et al., 2001). Ce phénomène complexe, impliquant une diversité de réactions cellulaires et moléculaires, a été étudié chez plusieurs mollusques bivalves, *C. virginica* (Cheng, 1996), *Tapes semidecussatus* (Montes et al. 1995), *Mercenaria mercenaria* (Smolowitz et al., 1998). Récemment, une étude de Wootton et al., (2006) a démontré que lors de l'attachement cellulaire et de l'encapsulation chez le mollusque *Cerastoderma edule*, les forces électrostatiques non spécifiques ainsi que les facteurs humoraux du plasma inter-réagissent l'un sur l'autre pour la médiation de la réponse immuno-hémocytaire.

### II. 3. 4. Prolifération cellulaire

Chez les mollusques, à ce jour, l'implication de la prolifération cellulaire dans le système immunitaire n'a pas été décrite, alors que chez les crustacés, la prolifération cellulaire semble être impliquée dans la réponse aux infections microbiennes (White et Ratcliffe, 1982, Sequeira et al., 1996; Muñoz et al., 2002). La prolifération cellulaire est particulièrement associée à des phénomènes hémocytaires de migration et d'agrégation au niveau des sites infectieux qui impliqueraient le non retour de ces hémocytes dans la circulation (Martin et al., 1993). Des phénomènes hémocytaires tels que la migration et l'agrégation aux sites d'infection ont été observés chez les mollusques (Renault et al., 1994a; Renault et al., 1994b) mais non démontré à ce jour associés à un déclenchement de l'hématopoïèse.

Par ailleurs, chez *C. gigas*, *Cg-Tal*, un gène homologue à Tal1/SCL de vertébré qui est un gène indicateur de la prolifération cellulaire, a été isolé par une approche de «Differential Display-PCR» (DD-PCR), (Barreau-Roumiguiere et al., 2003). Des analyses phylogénétiques ont montré que ce gène appartient à une famille de facteurs de transcription bHLH. Chez les vertébrés, l'activation de l'expression de Tal1/SCL est essentielle pour le déclenchement de l'hématopoïèse et la formation de cellules précurseurs d'hémocytes (Shivdasani et al., 1995; Porcher et al., 1996). Considérant la fonction de Tal1/SCL chez les vertébrés, *Cg-Tal* est susceptible de constituer un outil pour étudier la lignée hématopoïétique et les sites de l'hématopoïèse chez l'huître. De plus, deux gènes connus comme régulateurs du cycle

cellulaire et spécifiquement exprimés dans des cellules hématopoïétiques ont été identifiés dans une banque EST « Expressed Sequence Tag » obtenue à partir d'hémocytes d'huître (Gueguen et al., 2003). Le premier est homologue à LckBP1, une protéine de souris produite seulement dans des cellules souches hématopoïétiques (Takemoto et al., 1995). Le deuxième est homologue à une protéine de *Drosophila* Drac3, petite GTPase de la famille Rho, impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose. Drac3, fortement exprimé dans les hémocytes précurseurs, est un élément essentiel pour la différenciation des cellules matures chez *Drosophila* (Sasamura et al., 1997).

#### II. 4. Effecteurs de l'immunité innée chez les Bivalves

La réponse immunitaire humorale, tant chez les vertébrés que chez les invertébrés, s'effectue par l'intermédiaire de molécules solubles produites principalement par les cellules sanguines, cependant des effecteurs sont aussi produits par des tissus (Terai et al., 1997; Fleer, 2000; Bachère et al., 2004; Acharya et al., 2004; Dommett et al., 2006). Différents types d'effecteurs de l'immunité ont été décrits chez l'huître.

##### *Les lectines*

Les lectines glycoprotéines capables de se fixer spécifiquement à des oligosaccharides, sont les premiers effecteurs décrits impliqués dans le mécanisme de défense et de reconnaissance du non-soi (Vasta et al., 1994). Elles sont activées en présence de pathogènes (virus, bactéries, champignons et parasites) par reconnaissance de ses ligands et sont ubiquitaires dans le règne animal. Leurs propriétés d'opsonisation et d'agglutination permettent d'immobiliser les pathogènes et de déclencher les mécanismes de phagocytose ou d'encapsulation. Chez *C. gigas*, deux gicalines –E et –H capables d'agglutiner des bactéries tels que *Vibrio anguillarum* ont été identifiées (Olafsen et al., 1992). De plus, deux autres types de lectines impliquées dans la reconnaissance cellulaire ont été isolés par une approche d'ESTs à partir d'hémocytes d'huîtres stimulées, les ficolines et les galectines (Gueguen et al., 2003). Les ficolines sont des lectines avec des domaines de collagène et de fibrinogène, impliquées dans la première ligne de défense contre les pathogènes comme récepteur impliqué dans la phagocytose (Teh et al., 2000). Les lectines de type ficoline déclenchent l'activation de la voie alternative des lectines par activation de diverses serines protéases MASPs (« MBL-associated Serines Protéases ») qui sont capables de cliver des composantes de la cascade du complément des mammifères (Fujita et al., 2004). Les galectines sont caractérisées par leur affinité aux sucres de type  $\beta$ -galactosides (Cooper et Barondes, 1999). Il existe différentes galectines, classées en fonction de leur structure allant de polypeptides

contenant un CRD pouvant former des homodimères (galectine-1 et -2) ou des monomères (-5, -7, -10), à des tandems de différents CRDs (-4, -6, -8, -9). Leur implication dans l'immunité est encore mal définie. Chez les vertébrés, les galectines pourraient avoir un rôle dans l'interaction entre les cellules immunitaires (lymphocytes T et macrophages) et dans leur activation (production d'espèces oxygénées réactives par les neutrophiles). Elle participerait également à la stimulation d'un récepteur du complément (CR3) au niveau des macrophages (Barondes et al, 1994; Yamaoka et al., 1995) et pourraient être impliquées dans une variété de processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose, l'adhésion cellulaire, la réparation de lésions et l'encapsulation (Vasta et al., 1999; Sato et al., 2002, Rabinovich and Gruppi, 2005). Chez l'huître, une nette augmentation de l'abondance des transcrits de galectine a été observée dans les hémocytes en réponse à une injection de bactéries non pathogènes (Gueguen et al., 2003).

### *Les protéines de liaison aux LPS*

Les LPS sont les composants essentiels des bactéries à Gram (-) qui activent fortement le système immunitaire inné (Miyake, 2004). Le lipide A, un des constituant des LPS, est doué de propriétés toxiques et il correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram (-), qui n'est libérée de manière massive qu'après lyse de la bactérie. Chez *C. gigas*, au cours de l'analyse des bases de données d'ESTs d'hémocytes, une séquence présentant des homologies significatives avec des protéines de la famille des LBP (« LPS Binding Protein ») et BPI (« Bactericidal-Permeability-Increasing protein ») de vertébrés a été identifiée (Gonzalez, 2005). La modélisation tridimensionnelle ainsi que la répartition des charges et le calcul du point isoélectrique de la protéine ont conduit à la rapprocher plus d'une BPI que d'une LBP. La capacité de cette protéine à perméabiliser la membrane externe des bactéries ainsi que sa capacité à se lier aux LPS a confirmé qu'il s'agissait d'une protéine BPI, appelée *Cg-BPI* (Gonzalez, 2005). Les analyses d'expression de *Cg-BPI* ont révélé que ce gène est exprimé de façon constitutive au niveau des épithélia de la plupart des tissus de l'huître. Par contre une augmentation de l'activité transcriptionnelle de *Cg-BPI* a été observée au niveau de hémocytes à la fois dans les cellules circulantes et dans les cellules infiltrant les tissus. L'augmentation de cette expression était accompagnée d'une augmentation importante du nombre d'hémocytes qui exprime ce gène, révélant une réaction systémique (Gonzalez, 2005). *Cg-BPI* pourrait ainsi participer à une première ligne de défense et aussi être impliquée dans la réponse immunitaire aiguë lors d'une infection. Chez les vertébrés BPI est impliquée dans de nombreuses activités vis-à-vis des bactéries Gram (-), activité cytotoxique par son



action sur la membrane lipidique externe et interne, opsonisation pour accroître la phagocytose par les neutrophiles et neutralisation des LPS des bactéries ou endotoxines (Levy, 2000). BPI est homologue à 44% à LBP mais leurs activités biologiques sont différentes, alors que BPI est bactéricide pour les bactéries Gram (-), LBP n'a pas d'activité antimicrobienne mais peut servir comme intermédiaire pour la fixation du LPS au CD14 (Lovine et al., 1997; Beamer, 2003). Les BPI et les LBP interviennent dans l'immunité innée en réponse à une infection bactérienne en modulant la réaction inflammatoire (Weiss, 2003). Chez l'huître, deux protéines capables de se lier aux LPS ont été isolées à partir du plasma, Cg-LBP et Cg-EcSOD qui se sont révélées être les deux protéines majoritaire observables dans le plasma analysé par SDS-PAGE (Gonzalez, 2005; Gonzalez et al., 2005). Les données expérimentales obtenues pour Cg-LBP sur l'affinité aux LPS permettent de proposer que cette protéine peut participer dans les mécanismes de reconnaissance et d'opsonisation des bactéries Gram (-) (Gonzalez, 2005). La protéine, Cg-EcSOD pour «*Crassostrea gigas* Extracellular SuperOxide Dismutase» a été identifiée comme une Cu/ZnSOD selon la séquence N-terminal et l'activité biologique (Gonzalez et al., 2005). Ces auteurs ont montré que l'expression de Cg-EcSOD est spécifique des hémocytes et mis en évidence l'effet antioxydant et la propriété de liaison aux LPS de cette molécule, conduisant à l'élimination des microorganismes. La protéine Cg-EcSOD peut avoir une activité d'opsonisation qui favorise l'identification et l'élimination des bactéries par liaison aux intégrines des hémocytes. Compte tenu de son activité SOD, la molécule participerait à la régulation de la réponse inflammatoire induite par une infection, par la détoxification des tissus internes ou par l'amélioration de la capacité des hémocytes à résister à des dommages oxydatifs (Gonzalez et al., 2005).

### *Les enzymes hydrolytiques*

Ces enzymes sont responsables de l'hydrolyse de particules intra ou extracellulaires et sont des éléments importants du système de défense chez les mollusques. Chez les bivalves plusieurs enzymes hydrolytiques ont été étudiées: lysozyme,  $\beta$ -glucuronidase, phosphatases acide et alcaline, (Moore et Gelder, 1985; Beckman et al., 1992; Torreilles et al., 1997).

Le lysozyme est une enzyme cationique à activité bactéricide, contenue dans les granules des neutrophiles chez les vertébrés. Il a été caractérisé pour sa capacité de liaison aux LPS (Ohno et Morrison, 1989). Dans un premier temps, il se lie par une interaction électrostatique au groupe phosphate du Lipide A qui est suivi par une interaction hydrophobe (Brandenburg et al., 1998). Cette enzyme est retrouvée dans le plasma et les hémocytes de nombreuses

espèces de bivalves. Ainsi une importante activité de lysozyme a été mesurée dans le plasma et dans les hémocytes de *M. edulis* (Pipe, 1990), *M. galloprovincialis* (Carballal et al., 1997), *C. virginica* (Rodrick et Cheng, 1974; Xue et al., 2004) et *C. gigas* (Mon et al., 1984). Par une approche génomique une séquence EST ayant des homologies significatives avec le lysozyme a été identifiée à partir de la glande digestive de *C. gigas* exposées à des hydrocarbures (Boutet et al., 2004). Matsumoto et al., (2006) ont caractérisé une séquence codante complète d'un gène de lysozyme également à partir de la glande digestive de *C. gigas* et d'*O. edulis*. Ces auteurs ont montré que ce gène s'exprime dans tous les tissus de l'huître y compris dans les hémocytes et que le lysozyme serait synthétisé dans les cellules basophiles des tubules digestifs. Néanmoins, Xue et al., (2004) ont suggéré que le lysozyme purifié à partir de la glande digestive est différent de celui purifié à partir des hémocytes chez *C. virginica* et Olsen et al., (2003) ont reporté que les nombreuses formes d'activité des lysozymes reflétaient l'existence de gènes multiples.

La  $\beta$ -glucuronidase peut hydrolyser les acides mucopolysaccharidiques qui sont des composants de la paroi bactérienne (Cheng, 1983). Elle est retrouvée dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe chez *C. virginica* (Cheng et Rodrick, 1975) et dans la fraction acellulaire et les hémocytes des *C. gigas* et *O. edulis* (Xue et Renault, 2000).

Les phosphatases acide et alcaline ont été trouvées chez *C. virginica* (Cheng et Downs, 1988), *O. edulis* et *C. gigas* (Xue et Renault, 2000). Une haute activité de ces enzymes hydrolytiques dans l'hémolymphe de *O. edulis* et *C. gigas* est un indicateur de bon fonctionnement des hémocytes lors de la phagocytose.

### *Les peptides antimicrobiens*

Chez les bivalves, les premiers peptides antimicrobiens ont été caractérisés chez les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (Charlet et al., 1996; Mitta et al., 2000a) par une approche biochimique. Quatre familles de peptides cationiques, riches en cystéines, ont été identifiés, défensines (Mitta et al., 1999b), myticines (Mitta et al., 1999a) mytilines (Mitta et al., 2000 b) et mytimicines (Mitta et al., 2000a). Ces effecteurs de l'immunité innée, répandus dans tout le règne vivant, ont des spectres d'activité très large vis-à-vis des microorganismes et agissent selon des modes d'action très variables. Récemment, des peptides antimicrobiens de la famille des défensines ont été caractérisés chez les huîtres *C. virginica* et *C. gigas*. Chez *C. virginica*, ce peptide a été purifié à partir des branchies, la comparaison de la séquence en acides aminés a montré des homologies élevées avec les défensines d'insectes ainsi qu'avec celles de *M. edulis* et de *M. galloprovincialis* (Seo et al., 2005). Simultanément, chez *C.*

*gigas*, des approches de génomique fonctionnelle ont permis de caractériser une première défensine, *Cg-def*, exprimée en permanence dans le manteau (Gueguen et al., 2006). Puis, deux isoformes de défensine ont été caractérisées à partir d'hémocytes, *Cg-defh1* et *Cg-defh2* (Gonzalez et al., 2007). Des premières expériences d'analyse d'expression des gènes suggèrent que *Cg-defh2* est exprimée constitutivement dans les hémocytes circulants. Des infections bactériennes expérimentales conduiraient à une mobilisation des hémocytes exprimant *Cg-defh2* au niveau des tissus de l'huître comme le manteau et les branchies, suggérant que *Cg-defh2* pourrait jouer un rôle dans la réponse de défense chez l'hôte.

### *Les protéines de stress*

Ce sont des protéines produites lors d'un stress tels que des lésions, des infections, des changements environnementaux et des polluants. Les protéines de stress induites par des changements de température (« heat shock proteins ») sont des protéines chaperones multifonctionnelles permettant l'élimination des molécules dégradées. Chez *C. gigas*, ces protéines ont été identifiées dans les branchies et la glande digestive (Boutet et al., 2003). Des métallothionines interviennent dans les processus de détoxification intracellulaire. Ces protéines, riches en cystéines, se lient principalement aux métaux afin de prévenir leur diffusion vers l'extérieur (Simkiss et al., 1982). Elles sont également impliquées dans une variété de processus cellulaires, tels que la prolifération et la différenciation de cellules, la réponse de phase aiguë, la réponse immune et l'embryogenèse (Coyle et al., 2002). Chez *C. virginica*, des ARNm de métallothionines ont été détectés dans les hémocytes (Butler et Roesijadi, 2001). Chez *O. edulis*, ces protéines semblent jouer un rôle mineur dans la séquestration du métal (Tanguy et al., 2003). Chez *C. gigas*, David et al., (2005) ont identifié dans le manteau et les branchies un gène homologue à des métallothionines, impliqué potentiellement dans la réponse au stress oxydatif et à la régulation de l'hypoxie.

### *Les protéases et inhibiteurs de protéases*

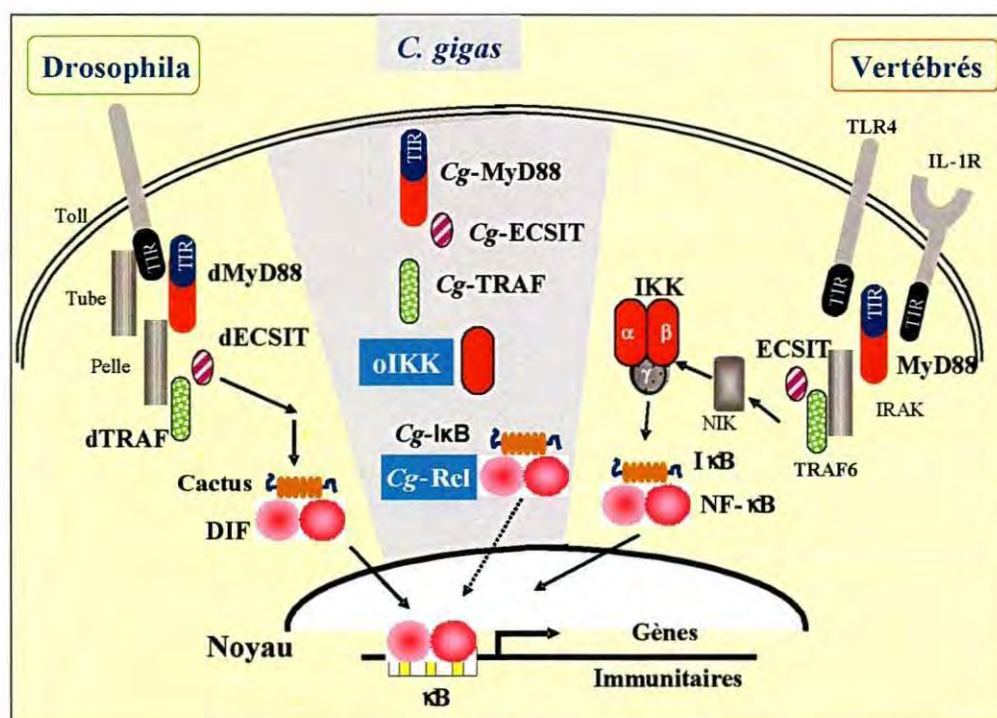
Le rôle des protéases et inhibiteurs de protéases a été bien caractérisé dans les réactions de la mélanisation, du système prophénoloxidase, et de la coagulation de l'hémolymphe chez les invertébrés (Söderhall et Cerenius, 1998; Kanost, 1999). Les cathepsines sont des cystéines protéases lysosomales, impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que le remodelage des matrices extracellulaires, l'apoptose, la dégradation des protéines dans le lysosome (Frlan et Gobecn 2006). Chez *C. gigas*, une procathepsine L a été isolée à partir de la glande digestive de *C. gigas* exposée à des hydrocarbures et l'expression de ce gène

augmente chez les animaux exposés aux hydrocarbures et au glyphosate (Boutet et al., 2004; Tanguy et al., 2005). Les inhibiteurs agissent contre les protéases de bactéries et de protozoaires pathogènes. Les protéases constituent de véritables facteurs de virulence chez les pathogènes leur permettant de s'introduire dans l'hôte et d'y proliférer (Labreuche et al., 2006). Parmi les inhibiteurs de protéases, l' $\alpha$ 2-macroglobuline a la propriété d'inhiber la plupart des protéases en raison de son mode d'action de «piégeage» de ces dernières (Hibbetts et al., 1999). Sous l'action d'une protéase, la conformation de l' $\alpha$ 2-macroglobuline change, exposant un domaine servant de ligand aux récepteurs des phagocytes. L' $\alpha$ 2-macroglobuline a été identifiée chez des bivalves, comme le pétoncle *Chlamys farreri* (Ma et al., 2005) et l'huître *C. gigas* (Gueguen et al., 2003). Un autre groupe d'inhibiteur de protéases est constitué des serpines «serine-protease inhibitor». Elles participent notamment à la régulation des protéases à sérines au cours de l'inflammation, de la coagulation, et de l'activation du complément. Des serpines ont été décrites chez plusieurs invertébrés (*Cenorhabditis elegans*, *Tachypleus tridentatus*, et *Drosophila sp.*, (Silverman et al., 2001). Un ADNc de serpine a été identifié chez *C. gigas* mais à ce jour sa fonction n'a pas encore été définie (Gueguen et al., 2003). Par ailleurs, Tanguy et al., (2004) ont isolé une séquence homologue à une *Pernine* chez *C. virginica* en réponse à une exposition au parasite *Perkinsus marinus*. Cette protéine présente une activité similaire à celle des serpines qui ont un rôle d'inhibiteur de la croissance de *P. marinus* (Gauthier et Vasta, 1994). Enfin, les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP) ont pour rôle de réguler l'activité des métalloprotéases de la matrice extracellulaire et de ce fait interviennent dans la réparation tissulaire (Nagase et Woessner, 1999). Chez l'huître *C. gigas*, des gènes *Cg-Timp* ont été identifiés (Montagnani et al., 2001, 2005). Ces auteurs ont montré que l'abondance des transcrits de ces gènes est fortement accrue dans des hémocytes en réponse à des injections de surnageants de *Vibrio* suggérant une implication dans la réponse à l'infection bactérienne chez l'huître. De plus, ils ont mis en évidence une accumulation des ARNs de *Cg-timp* dans des animaux en réponse à une lésion de la coquille, ce qui suggère que *Cg-timp* aurait un rôle dans les mécanismes de réparation liés au remodelage des matrices extracellulaires.

### *Eléments de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B*

Chez les vertébrés, la réponse immunitaire est initiée par la reconnaissance des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce phénomène provoque l'activation de récepteurs cellulaires et des voies de signalisation impliquées dans la réponse aux stress et la réponse immunitaire (Mathey-Prevot et Perrimon,

1998; Ip et Davis, 1998; Leppa et Bohmann, 1999). Parmi les voies de signalisation, la voie NF- $\kappa$ B a été décrite comme une voie conservée au sein du règne animal et comme jouant un rôle clé dans la réponse immunitaire régulant un nombre important de gènes de la réponse inflammatoire (Hoffmann et al., 1999; Hoffmann et Reichhart, 2002). Chez l'huître *C. gigas*, l'établissement d'une banque d'ESTs d'hémocytes (Gueguen et al., 2003) a permis de mettre en évidence des composants de la voie de signalisation de type Rel/NF- $\kappa$ B impliquée dans la régulation de l'expression des gènes immunitaires (Figure 16). Quatre ADNc homologues à des molécules adaptatrices et des facteurs de transcription de la voie NF- $\kappa$ B des vertébrés et de *Drosophila* ont été isolés : MyD88, TRAF, ECSIT et un homologue de I $\kappa$ B chez la *Drosophila* (Cactus) (Aderem et Ulevitch, 2000; Hoffmann et Reichhart, 2002). De plus, la caractérisation des gènes *oIKK* et *Cg-Rel* (Escoubas et al., 1999; Montagnani et al., 2004) tendent à confirmer l'existence de la cascade Rel/NF- $\kappa$ B chez l'huître. Par ailleurs, par une approche de banque soustractive un gène homologue à Toll-like récepteur 4 a été mis en évidence chez *C. virginica* en réponse à une exposition à *P. marinus* (Tanguy et al., 2004).



**Figure 16:** Schéma de la voie Rel/NF- $\kappa$ B chez *Drosophila*, *Crassostrea gigas* et les vertébrés. Les différents éléments caractérisés chez *C. gigas* présentent des homologies avec les éléments de la voie Toll/IMD de la *Drosophila* et de la voie NF- $\kappa$ B des Vertébrés. (Montagnani et al., 2004).

### III. Agents pathogènes et mortalités estivales chez l'huître

Les principaux agents pathogènes qui affectent les mollusques bivalves d'intérêt économique sont listés dans le "Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish" (Bower et al., 1994; Bower et McGladdery, 2003). De nombreux épisodes de mortalité ont été observés dans le genre *Crassostrea* (Imai et al., 1965; Glude, 1975; Gouletquer et al., 1998) et une grande variété d'agents pathogènes tels que des bactéries, des virus, des protozoaires et des champignons y a été associée. Ces agents pathogènes affectent chacune des étapes de la production, les larves, les juvéniles et les adultes bien que des différences de susceptibilité soient observées entre ces différentes phases de production.

#### III. 1. Agents pathogènes

##### III. 1.1. Bactéries

Divers genres de bactéries associées aux huîtres *Crassostrea* comme les *Vibrios*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* ou *Pseudomonas* ont été isolés, en raison de la capacité de ces animaux à filtrer et à concentrer les microorganismes (Laukner, 1983; Paillard et al., 2004). Le pouvoir pathogène de ces bactéries vis-à-vis des mollusques est parfois difficile à mettre en évidence. En effet, des bactéries du genre *Vibrio* et *Pseudomonas* font partie de la flore microbienne commensale et numériquement dominante du tube digestif et de l'hémolymphe des coquillages (Prieur, 1976, 1982) et ces mêmes bactéries peuvent être impliquées dans des maladies chez ces animaux. Les épisodes de mortalités décrits dans la littérature concernent principalement les stades larvaires et juvéniles aussi bien en structure fermée (écloseries, nurseries) qu'en milieu naturel (Prieur, 1987, Sinderman, 1990).

Le genre *Vibrio* est le plus souvent rapporté comme étant impliqué dans les mortalités chez l'huître. Dans la littérature, différentes espèces de *Vibrio* ont été identifiées en tant que microorganismes pathogènes dans les cultures larvaires des huîtres du genre *Crassostrea* (Elston et Leibovitz, 1980; Nicolas et al., 1992; Sugumar et al., 1998). Les bactéries responsables et les lésions occasionnées chez les larves de *C. gigas* sont citées dans le **Tableau 1**.

En 1980, Elston et Leibovitz ont montré le pouvoir pathogène de *Vibrio sp.* lors d'expérimentations sur des larves de *C. virginica*. D'après ces auteurs, les vibrios agissent sur la coquille, le manteau, les cellules du vélum et les cellules de la glande digestive, provoquant une nécrose des tissus et une perturbation de l'alimentation et de la croissance de la larve

(Lodeiros et al., 1987). De plus, des symptômes tels que l'inhibition de la filtration (McHenry et Birkbeck 1986), la diminution de la mobilité des larves et une tendance à sédimenter, ont été décrits par Nottage et Birkbeck (1987) et Nottage et al., (1989). Vingt-quatre heures après l'exposition à l'agent pathogène, la colonisation des tissus par les bactéries est massive et les tissus sont détruits conduisant irrémédiablement à la mort de l'huître. En France, depuis 1991 des mortalités estivales sont régulièrement rapportées dans les populations de juvéniles d'huître *C. gigas* dans lesquelles plusieurs souches de *V. splendidus* ont été détectées (Lacoste et al., 2001; Le Roux et al., 2002; Waechter et al., 2002). Bien que ces agents ont été démontrés pathogènes expérimentalement, la cause de ces mortalités ne pouvait pas être attribuée à ces agents (Le Roux et al., 2002).

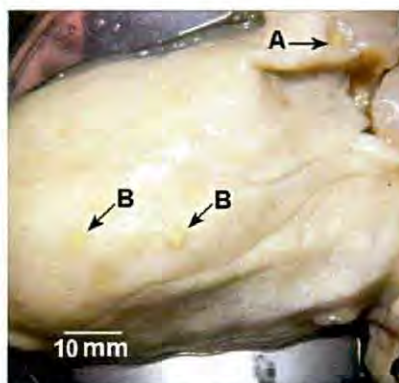
**Tableau 1.** Espèces de *Vibrio* pathogènes des larves de *Crassostrea gigas*. Modifié d'après Gay, 2004

Agents pathogènes	Lésions	Références
<i>V. anguillarum</i>	Sédimentation des larves, bactéries proliférantes autour des larves moribondes	(Di Salvo et al., 1978)
3 souches proches de <i>V. nereis</i> , <i>V. splendidus</i> et <i>V. anguillarum</i> et de Tubiash (1970)	Présence de fragments de ciliature détachés, vélum anormal, nage réduite, sédimentation des larves, présence de bactéries au bord de la coquille, nécrose tissulaire du manteau	(Jeffries, 1982)
5 souches de <i>Vibrio sp.</i>	Perte de mobilité, anomalies de structure et de fonction du vélum et des organes internes, forte nécrose	(Garland et al., 1983)
5 souches de <i>V. splendidus II</i>	Perte de ciliature et du vélum, présence de bactéries autour de la coquille, "nécrose bacillaire"	(Sugumar et al., 1998)
<i>V. alginolyticus</i>	Nage réduite, paralysie des cils, estomac vide, nécrose, présence de bactéries autour du vélum	(Luña-Gonzalez et al., 2002)

Des bactéries du genre *Cytophaga* ont été rapportées comme responsables de la maladie du ligament de la charnière chez les juvéniles et adultes de *C. virginica* et *C. gigas* aux USA (Dungan et Elston, 1988; Elston, 1993). Cette maladie bien que sporadique, induit des fortes mortalités (70-90 % en une semaine). Une nécrose tissulaire est provoquée dans la cavité palléale et les tissus du manteau sont envahis par ces bactéries (Dungan et al., 1989).

Une autre bactériose, due à des espèces non identifiées du genre *Nocardia*, est observée, chez *C. gigas* aux USA et au Japon (Friedman et al., 1998). D'après ces auteurs, les mortalités résultent de l'effet synergique des bactéries et des conditions d'élevage. Les animaux malades

ont montré quelques lésions de manteau, une mauvaise fermeture de la coquille et la présence de granules jaunes ou gris bruns sur le manteau et parfois, la présence de pustules sur les muscles adducteurs (**Figure 17**).



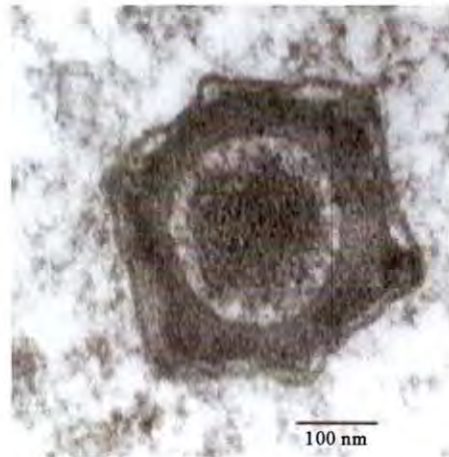
**Figure 17:** *Crassostrea gigas* avec des lésions dans le muscle adducteur (A) et à la surface du corps (B) provoqué par *Nocardia* sp. Bower et McGladdery (2003).

Enfin des cas d'infections par les genres *Rickettsia* et *Chlamydia* ont été décrits (Azevedo et Villalba, 1991; Renault et Cochenec, 1995). Ces bactéries sont généralement intracytoplasmiques et détectées principalement dans l'épithélium des branchies, du tractus digestif et du manteau. Les infections sont généralement de faible intensité et n'induisent pas de mortalité massive chez l'huître adulte (Renault et Cochenec, 1994).

### III. 1. 2. Virus

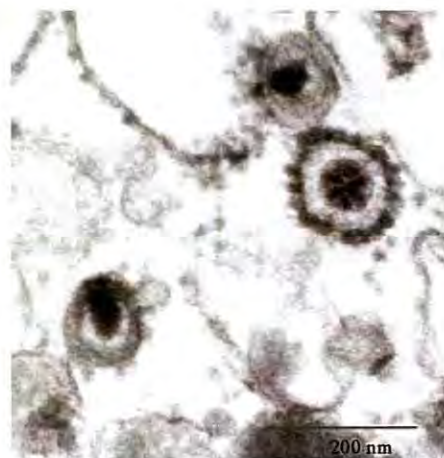
Des fortes mortalités ont été associées à la présence de virus dans plusieurs espèces d'huîtres, qui affectent tous les stades du cycle de vie. Des iridovirus (**figure 18**) ont été décrits comme agents responsables de pathologies chez les huîtres dans différents pays. En France, deux infections pathologiques ont été rapportées chez les huîtres portugaises adultes, *C. angulata* (Comps et Duthoit, 1976; Comps 1980). La première, dénommée "maladie des branchies", a été à l'origine des mortalités récurrentes qui ont conduit à la disparition de *C. angulata* du littoral français de 1966 à 1968 (Comps, 1988). Un virus identique a également été associé à des pathologies dans des populations de *C. gigas* (Comps et Bonami, 1977). La seconde appelée "maladie hémocytaire" a provoqué des mortalités massives chez *C. angulata* en 1970 (Elston et Wilkinson, 1985; Comps, 1988). Par ailleurs, la "maladie du vélum" (OVVD Oyster Velar Virus Disease), également due à un iridovirus, a été décrite sur des larves véligères de *C. gigas* en éclosure, sur la côte occidentale d'Amérique du nord (Elston, 1979; Elston et Wilkinson, 1985). La maladie du vélum se caractérise par une nage anormale ou une perte de la mobilité de la larve infectée qui a tendance à sédimenter.





**Figure 18:** Particule d'un « Irido-like virus » de *Crassostrea angulata*. Le virion est de symétrie icosaédrique. Renault et Novoa (2004)

Un virus de type herpes (**Figure 19**) a été signalé pour la première fois chez l'huître *C. virginica* par Farley et al., (1972). Pendant l'été 1991, dans des écloséries de Nouvelle Zélande et du nord de la France, des mortalités anormales ont été observées chez cinq espèces d'huîtres, incluant des larves et des naissains de *C. gigas* (Hine et al., 1992; Nicolas et al., 1992; Renault et al., 1994b; Arzul, 2001). Au cours des étés 1993, 1994 et 1995 dans le milieu naturel, de fortes mortalités (80-90 %) du naissain ont également été associées à la détection d'un virus de type herpes nommé OsHV1 (Renault et al., 1995; Renault et al., 2000a). Sa pathogénicité a été démontrée par infection expérimentale de larves de *C. gigas* en culture axénique (Le Deuff et al., 1994). Les infiltrations hémocytaires associées aux lésions sont réduites (Renault et al., 1994a; Renault et al., 1994b) et les adultes, par comparaison aux jeunes stades, semblent moins sensibles (Arzul et al., 2002).



**Figure 19:** Particules d'un « herpesvirus like » (OsHV 1) observées à partir de larves de *Crassostrea gigas*. Les particules virales sont hexagonales allongées. Renault et Novoa (2004).

D'autres virus ont également été identifiés chez *C. gigas* tels que des virus de la famille des Papaviridae (Farley, 1978) et des Reoviridae (Hill, 1976), mais leurs impacts sur les élevages larvaires restent inconnus en raison de l'absence d'études épidémiologiques et de moyen d'identification spécifique.

### III. 1. 3. Protozoaires et Champignons

#### Protozoaires

Plusieurs protozoaires parasites ont été décrits dans les différentes espèces d'huîtres *Crassostrea*. Ces protozoaires n'entraînent pas forcément la mort de leur hôte, mais sont responsables de retard de la croissance ou de perturbation de la reproduction chez les adultes. Par exemple, *Haplosporidium nelsoni* induit de fortes mortalités chez *C. virginica* suite à la destruction progressive de l'épithélium des diverticules digestifs (Ford et Haskin, 1982; Barber et al., 1991). Chez *C. gigas*, aucun symptôme de l'infection par *Haplosporidium* n'a été rapporté (Elston, 1999) mais des auteurs signalent que ce protozoaire peut être pathogène, particulièrement pour les huîtres juvéniles (Friedman, 1996; Renault et al., 2000b). Un autre protozoaire, *Mikrocytos mackini* provoque une infection intracellulaire spécifique des cellules vésiculaires du tissu conjonctif de *C. virginica* (Farley et al., 1988). La maladie conduit à une nécrose des tissus due à la présence de pustules verdâtres sur le manteau et les palpes labiaux ainsi qu'à une infiltration d'hémocytes dans les tissus (Farley et al., 1988; Hine et al., 2001). A ce jour, ce parasite est localisé en Colombie Britannique (Canada) où il induit des mortalités de l'ordre de 15-35 %, et son spectre large d'hôte fait de ce parasite un danger potentiel (**figure 20**).



**Figure 20** : *Crassostrea gigas* sans la coquille, illustrant des lésions (flèches) occasionnées par *Mikrocytos mackini*, pendant l'étape avancée de la maladie. Bower, (2003).

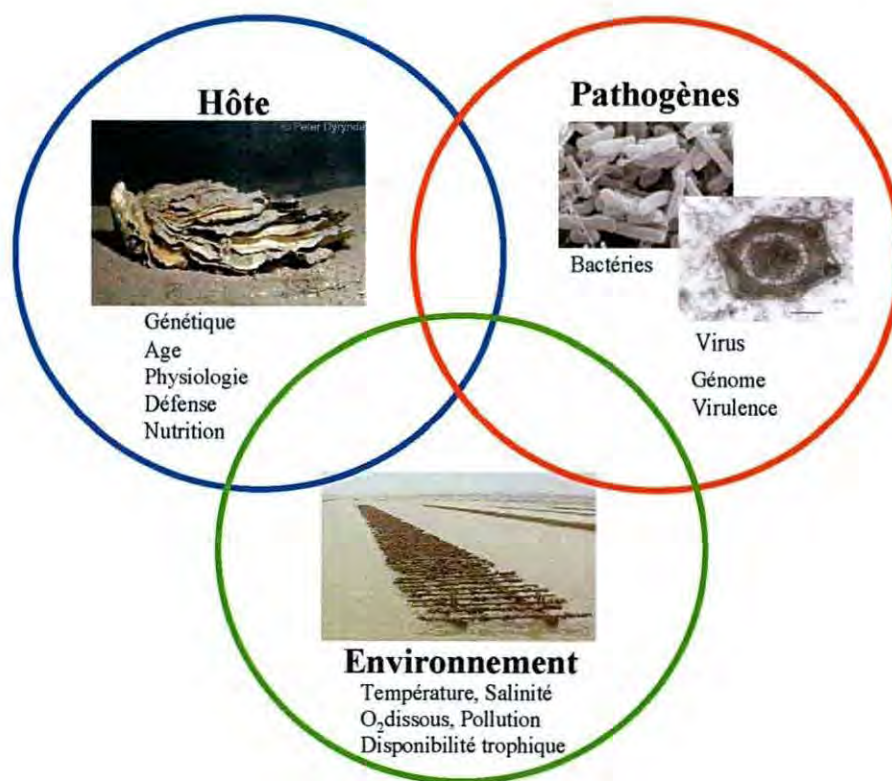
#### Champignons

Les connaissances sur les maladies d'origine fongique chez les bivalves, et surtout chez les huîtres sont rudimentaires. Ces agents fongiques semblent être des opportunistes et des

pathogènes facultatifs affectant l'hôte lorsqu'il est affaibli. Cependant, le champignon *Sirolpidium zoophthorum* a été décrit comme la cause de mortalités de larves en élevage et de populations naturelles chez *C. virginica* (Davis et al., 1954). Un autre champignon *Ostracoblabe implexa*, agent de la maladie «de la coquille, du pied ou de la charnière», se développe chez plusieurs espèces d'huîtres (Bower et McGladdery, 2003).

### III. 2. Mortalités Estivales

Selon Koganezawa (1974), le premier épisode de "mortalité estivale" chez *C. gigas*, a été observé au Japon en 1945 et au début des années 80 en France (Maurer et Comps, 1986). Depuis, la production d'huîtres a subi périodiquement des mortalités massives (Renault et al., 1994b; Gouletquer et al., 1998; Soletchnik et al., 1999). Ces mortalités affectent les juvéniles et les adultes (Glude, 1975; Maurer et al., 1986; Cheney et al., 2000). His et Robert (1985) ont également signalé des mortalités massives de larves, notamment dans le bassin d'Arcachon au cours de l'été 1976. Plusieurs études (Sholz et al., 1973; Maurer et Comps, 1986) ont montré des taux de mortalité très variables dans des zones d'élevage très proches, les taux variant de quelques pourcentages à plus de 60%, conduisant à des variations inter-annuelles très fortes. Les causes de ce phénomène de mortalités estivales sont multifactorielles et ce phénomène est la résultante des interactions entre 3 composantes, l'environnement, l'hôte et les pathogènes (**Figure 21**) (Samain et al., sous presse). Afin de mieux comprendre ce phénomène complexe, l'IFREMER a initié le programme MOREST (MORtalité ESTivale 2001-2005) basé sur une approche pluridisciplinaire. Ce programme a permis de classer progressivement l'importance des facteurs de risque en couplant les études en milieu naturel et en conditions expérimentales (Samain et al., 2004a; 2004b; Soletchnik et al., 2005). Parmi les facteurs responsables de ces mortalités estivales qui ont lieu entre juin et septembre, une forte composante génétique a été démontrée puisque Dégremont et al., (2005) ont isolé 2 souches d'huîtres, une dite résistante et une dite sensible, sur la base de la survie aux mortalités estivales, avec une héritabilité élevée du caractère survie. De plus, l'état de reproduction des animaux qui est dépendant des conditions environnementales, principalement de l'élévation de la température (>19°C) et de l'alimentation, ainsi que la proximité des huîtres du sédiment dans les zones d'élevage sont des facteurs de risque (Samain et al., sous presse; Gay, 2004). Enfin, la présence des pathogènes affectant les huîtres en périodes de mortalités estivales pourraient contribuer aux mortalités. Deux souches de vibrios pathogènes mais non stricts ont été identifiées dans le cadre des mortalités estivales, *V. splendidus* et *V. aesturianus* (Le Roux et al., 2002 et Labreuche et al., 2006).



**Figure 21:** Interaction d'un système à trois composantes intervenant dans le phénomène des mortalités estivales.

#### **IV. Moyens de lutte contre des maladies**

Traditionnellement, la production ostréicole repose sur des transferts d'animaux entre les zones géographiques et les pays, ce qui augmente les risques d'introduction de pathogènes et la propagation des maladies. Dans ce contexte de nombreuses méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement ont été mises en place.

##### **IV. 1. Pratiques d'élevage**

En ce qui concerne les pratiques d'élevage, il existe deux niveaux de prophylaxie. (1) **Une prophylaxie zoosanitaire** ayant pour but de réduire et si possible d'éliminer les risques d'introduction et de propagation des maladies des zones endémiques aux zones indemnes, ce qui suppose l'existence d'un réseau de surveillance basé sur des méthodes efficaces de diagnostic et d'échantillonnage, des procédures de contrôle et un cadre législatif. Des réglementations nationales, européennes et internationales essaient de répondre à ces problématiques. Par exemple, en 1902, le Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM) a été créé, il permet la coordination de la recherche dans l'océan Atlantique nord et les mers adjacentes et joue un rôle déterminant dans l'élaboration des avis scientifiques pour

la politique commune des pêches. (2) **Une prophylaxie zootechnique** qui vise les conditions d'élevage, notamment par l'amélioration des méthodes de culture. Elles consistent à prendre en compte les paramètres environnementaux (salinité, température, profondeur...), les densités d'élevage ainsi que l'alimentation et les facteurs de stress (transferts, manipulation ...). En milieu confiné, de nombreuses méthodes de désinfection de l'eau tels que la chloration, la déchloration et l'irradiation aux rayons ultra violets ont été testées avec succès pour éliminer ou réduire les agents pathogènes présents (Brown 1979; Brown et Russo 1979).

#### IV. 2. Prévention et traitements

Chez les mollusques comme chez tous les invertébrés et contrairement aux vertébrés, la vaccination n'est pas envisageable puisque leur système immunitaire de type inné est dépourvu de cellules productrices d'anticorps. **Le diagnostic** reste ainsi une des mesures les plus efficaces de prévention contre les maladies. Pour la détection et l'identification des pathogènes des outils plus performants basés sur la sensibilité et la spécificité réactionnelles ont été développés (Mialhe et al., 1995; Kong et al., 2002; Panicker et al., 2004). Des sondes anticorps monoclonales ont également été employées dans le diagnostic de l'herpès virus (Le Deuff et al., 1995). Enfin, des sondes nucléiques ont été mises au point pour la détection de protozoaires et de l'herpès virus OsHV1 (Le Roux et al., 1999; Cochenec et al., 2000; Renault et al., 2000a).

Compte tenu des pratiques d'élevage des huîtres, les moyens de lutte contre les pathogènes restent limités, ceci plus particulièrement en milieu ouvert. Cependant des essais de traitement ont eu lieu en laboratoire, seulement applicables à des structures confinées de type écloseries et nurseries. Les effets prophylactiques et thérapeutiques d'une grande variété d'**antibiotiques** ont été mesurés dans le traitement des animaux et des eaux des élevages des huîtres (Barg et Lavilla-Pitogo, 1996). Chez l'huître, des antibiotiques comme le cycloheximide et le streptomidone ont été utilisés contre *Dermocystidium marinum*, un champignon létal (Ray, 1966), ainsi que des antiparasitaires comme le dichlorvos, le bleu de méthylène ou le vert de malachite (Grizel, 1979). En conditions d'élevage intensif où le développement des pathogènes est favorisé, les antibiotiques ont été utilisés en routine (Nicolas et al., 1996). L'utilisation abusive de ces molécules en aquaculture a entraîné l'apparition de bactéries résistantes (Schmidt et al., 2001; Miranda et Zemelman, 2001). A ce jour, l'utilisation des antibiotiques à spectre large est réglementée au niveau international afin de limiter le développement et le transfert de résistance à des pathogènes humains. Suite à ces mesures, de nombreuses études se sont focalisées sur la possibilité d'utilisation de

**probiotiques** comme alternatif aux antibiotiques (Verschuere et al., 2000b; Irianto et Austin, 2002). En effet, les probiotiques, bactéries, levures ou algues ajoutées aux produits alimentaires, confèrent des effets bénéfiques sur la survie et la croissance des animaux en élevage (Gibson et al., 1998; Verschuere et al., 2000a; 2000b). Une étude réalisée sur *Aeromonas media* A199 a conduit à l'inhibition *in vitro* de 89 souches bactériennes du genre *Aeromonas* et *Vibrio*. De plus, ces probiotiques seraient capables d'empêcher des mortalités dans des élevages larvaires de *C. gigas* après une infection *in vivo* par *Vibrio tubiashii* (Gibson et al., 1998) en diminuant la quantité de bactéries pathogènes dans l'élevage. A ce jour, l'inoculation des bactéries antagonistes comme moyen prophylactique est une pratique commune dans la production animale (Fuller, 1999). En aquaculture les études s'orientent sur la recherche de microorganismes favorables comme ceux présentés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2.** Bactéries testées en tant qu'agents probiotiques dans les cultures des bivalves.

Microorganismes favorables	Cultures de bivalves	Références
<i>Vibrio</i> spp.	Oyster larvae	Elston et al., (1981)
<i>Alteromona</i> sp. CA2	<i>Crassostrea gigas</i>	Douillet et Langdon (1993, 1994)
<i>Alteromona</i> sp.	<i>Pecten maximus</i>	Ruiz et al., (1996).
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	<i>Argopecten purpuratus</i>	Riquelme et al., (1996)
<i>Vibrio</i> spp.	<i>Pecten maximus</i>	Nicolas et al., (1996).
<i>Aeromonas media</i> A199	<i>Crassostrea gigas</i>	Gibson et al., (1998)
<i>Roseobacter</i> sp. BS107	<i>Pecten maximus</i>	Ruiz-Ponte et al., (1999)
<i>Vibrio</i> sp. C33	<i>Argopecten purpuratus</i>	Riquelme et al., (1997, 2000, 2001)
<i>Pseudomonas</i> sp. 11, <i>Bacillus</i> sp. B2, <i>Arthrobacter</i> sp. 77	<i>Argopecten purpuratus</i>	Avendaño et Riquelme (1999)

Par ailleurs, **des immunostimulants** sont utilisés pour lutter contre les infections. En aquaculture diverses substances comme l'ovoglobuline, des composants de levures ou de bactéries tels que des  $\beta$ -glucanes ou des polysaccharides, ont été testés (Takahashi et al., 2000; Thanardkit et al., 2002; Jian et Wu, 2003). Chez *C. gigas*, pour prévenir la nécrose bacillaire causée par *Vibrio tubiashii* chez les larves, l'effet des ovoglobulines a été examiné (Takahashi et al., 2000). Les résultats obtenus indiquent que les ovoglobulines protègent les larves contre l'infection de *V. tubiashii* en empêchant la croissance de *V. tubiashii* sans affecter la survie des huîtres.

#### IV. 3. Sélection génétique

Les principaux objectifs des programmes de sélection chez les huîtres visent à améliorer des caractères d'intérêt commerciaux tels que les caractères liés à (1) la ponte et au développement larvaire; (2) l'amélioration de la survie et de la croissance (3) l'amélioration de la forme de la coquille (4) la morphométrie de l'huître et (5) la résistance à des facteurs environnementaux défavorables et la résistance aux maladies (Mahon, 1983). De nos jours, la survie et la croissance sont toujours les deux caractères prioritaires étudiés dans les programmes de sélection (Nell et al., 1999; Lymbery, 2000; Langdon et al., 2003). Concernant l'amélioration de la résistance vis-à-vis des maladies quelques cas ont été décrits. Les premières tentatives de sélection des souches résistantes ont été réalisées chez l'huître américaine *C. virginica*, pour réduire sa sensibilité à l'*Haplosporidium nelsoni*, cependant les taux de mortalité des souches résistantes ont augmenté après 5 ans (Ford et Haskin, 1987). Un programme de sélection de familles d'huîtres plates, *O. edulis*, tolérantes au parasite *B. ostreae* a été initié au début des années 90 et a conduit à la sélection de plusieurs familles dont la descendance présente une tolérance accrue vis-à-vis du parasite (Naciri-Graven et al., 1998). Chez *C. gigas*, les effets génétiques sur la croissance, la survie et l'effort reproducteur ont été étudiés (Ernande, 2001). Dans le cadre des mortalités estivales, différents niveaux de susceptibilités de *C. gigas* ont été observés parmi les stocks de diverses origines et parmi différentes familles produites en éclosion, mettant en évidence que la composante génétique pouvait être un facteur important pour la résistance au phénomène de mortalités estivales (Soletchnik et al., 2003; Ernande et al., 2004). Une première série de croisements a conduit à l'obtention de 72 familles biparentales qui ont été testées dans divers sites d'élevage afin de déterminer leur résistance aux mortalités estivales. La dynamique de la mortalité est spécifique à chaque famille et elle diffère entre sites d'élevage pour une même famille. Ces 2 points révèlent l'importance du facteur génétique et de sa plasticité, facteur qui est modulé par l'environnement. Selon les performances de survie de chacune des familles, 6 familles montrant un taux élevé de survie (familles dites résistantes et nommées R) et 6 familles montrant un taux élevé de mortalité (familles dites sensibles et nommées S) ont été sélectionnées pour créer une seconde génération. Une troisième génération a été produite selon le même protocole (Dégremont et al., 2005). Les familles R montraient un taux de survie très supérieur à celui des familles S pour l'ensemble des générations (G2 et G3), cependant aucune différence de croissance n'a été observée entre R et S. L'analyse des hérédités dans les 3 sites d'élevage indiquait que le caractère survie est fortement héréditaire et permet d'envisager une sélection efficace selon ce caractère (Dégremont, 2003).

## V. La réponse de l'hôte au cours de l'ontogénèse

Les mécanismes de défense dans les premiers stades du cycle de vie chez les invertébrés marins sont peu documentés, et l'information concerne principalement des données au niveau cellulaire. La phagocytose de bactéries par des cellules larvaires a été rapportée pour la première fois par Elston et Leibovitz (1980) chez *Crassostrea virginica*, lors d'étude sur la vibriose. Ces auteurs ont observé dans la cavité viscérale, des phagocytes mobiles contenant des fragments bactériens. Puis, Elston (1980) a décrit deux types de cellules sanguines chez les larves de *C. virginica* et *C. gigas* dans les stades de larve D et larve véligère. Ces cellules sanguines désignées sous le nom des coelomocytes sont de deux types. Un premier type correspondant à des cellules phagocytaires avec des granules intra-cytoplasmiques, similaires aux hémocytes granuleux des huîtres adultes, est attaché à la surface de la cavité viscérale. Le second type est décrit comme un ensemble de cellules non phagocytaires cuboïdes, de plus grande taille qui contiennent un réticulum endoplasmique lisse et abondant. Ce type cellulaire est localisé plus particulièrement dans la région de l'umbo de la cavité viscérale (**Figure 9**).

Des activités antimicrobiennes et cytotoxiques ont été trouvées dans les œufs et les larves d'invertébrés marins. En 1990, Canicatti a montré une activité antimicrobienne dans les oeufs et larves de l'oursin de mer, *Paracentrotus lividus* et une activité de type lysozyme a été mise en évidence par incubation d'un lysat larvaire avec *Micrococcus luteus*. Ces lysats auraient un effet toxique contre plusieurs espèces de bactéries, *Vibrio alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. sp.*, *Salmonella sp.*, et *Escherichia coli* (Stabili et al., 1994). Enfin, Kisugi et al., (1989) ont décrit le mode d'action d'une glycoprotéine antibactérienne, l'aplysianine E isolée à partir d'oeufs d'*Aplysia kurodai*. Cette substance, à doses variables, inhiberait la croissance des levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* et *Candida albicans* (Lijima et al., 1995).

La défense chimique est un mécanisme très étudié chez les adultes d'invertébrés marins benthiques. Le rôle potentiel de la défense chimique inclut la protection contre l'invasion et la prédation (Dyrynda, 1985). Ce mécanisme est effectué par des métabolites toxiques tels que les alcaloïdes ou les terpénoïdes (Hashimoto, 1979). La majorité de ces molécules présente des propriétés antimicrobiennes ou cytotoxiques. Plusieurs de ces molécules ont été trouvées aux premiers stades de développement d'échinodermes et de zoanthaires, telles que la palytoxine, de saponines et la didemnine (Hashimoto, 1979; Lucas et al., 1979; Lindquist et al., 1992). Ces composés pourraient être impliqués dans les réactions de défense des larves d'invertébrés marins (Dyrynda et al., 1995).



Par ailleurs, des études sur le niveau d'activité des enzymes hydrolytiques tels que les protéases, glycosidases, phosphatase, lipases et estérases au cours de l'ontogenèse chez *C. gigas* ont montré des variations d'activités entre les différents stades de développement (Luna-Gonzalez et al., 2004).

Au niveau moléculaire, des transcrits des peptides antimicrobiens, mytilin B et défensine (MGD2) chez *Mytilus galloprovincialis* n'ont été détectables que pendant ou peu de temps après la période de métamorphose (Mitta et al., 2000b). Chez *C. virginica*, des transcrits d'une méthallothionine (CvMT-III) ont été détectés dans des œufs et leur expression chez les larves est constitutive. En accord avec d'autres études, cette protéine serait impliquée dans l'embryogenèse et la différenciation cellulaire (Cserjesi et al., 1997; Angerer et al., 1986; De et al., 1991). Deux autres molécules ayant un rôle potentiel dans le processus de croissance ont été décrites chez l'huître, la première est une *Cg-Clp1* (*Crassostrea gigas* « chitinase-like protéine 1 », Badariotti et al., 2006). Des ARN messagers de cette molécule ont été trouvés en abondance dans le bord du manteau et la glande digestive. Les auteurs supposent que *Cg-Clp1* pourrait également être impliquée dans l'homéostasie de l'immunité, comme c'est le cas pour ses homologues de mammifères (YKL-40, YM1) et d'insectes (IDGFs) (Suzuki et al., 2000; De Gregorio et al., 2001; Levy et al., 2004; Vierstraete et al., 2004). La seconde est la protéine *Cg-TGFβRI* pour *Crassostrea gigas* « Transforming Growth Factor β Receptor Type I » (Herpin et al., 2005). Chez les vertébrés, la voie TGF-β est impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire (Cromack et al., 1991). Chez l'huître, Herpin et al., (2005) ont montré qu'il n'y avait pas de changement d'expression de ce gène dans les hémocytes d'huîtres injectées avec des LPS de bactéries, mais une surexpression de ce gène dans le bord du manteau suggérant l'implication de cet organe dans la première barrière de défense contre l'invasion des pathogènes. Ce gène a deux pics d'expression au cours du développement chez les lophotrochozoaires, qui se situent au moment des 2 principaux événements, la morphogenèse précoce (larve trocophore) et la métamorphose. Ce qui suggère que *Cg-TGFβRI* a un rôle similaire à ses homologues chez les vertébrés.

Malgré l'existence d'une susceptibilité plus grande aux stress biotiques ou abiotiques des jeunes stades de *Crassostrea gigas*, qui est un problème majeur pour la production conchylicole, cet aperçu bibliographique montre le manque de connaissance sur l'ontogenèse du système immunitaire de l'huître. Afin de tenter de combler en partie cette lacune, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont pour objectifs d'étudier la mise en place du

système immunitaire de cette espèce au cours du développement. Nos résultats seront présentés en 3 chapitres:

**Le premier chapitre** présentera, au cours du développement, l'analyse des profils d'expression de 18 gènes isolés à partir d'hémocytes d'huîtres adultes et potentiellement impliqués dans l'immunité. Les profils d'expression de plusieurs de ces gènes après une exposition à des bactéries non pathogènes ont été étudiés à différents stades de développement.

**Le second chapitre** est consacré à l'identification de gènes nouveaux différentiellement exprimés au cours du développement, à travers la construction de banques soustractives.

**Le dernier chapitre** présente la caractérisation de *Cg-MyD88*, une protéine adaptatrice, spécifique de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B chez les vertébrés. La localisation et la cinétique d'expression de ce gène sont étudiées au cours du développement, notamment après un stress bactérien.

Dans une dernière partie intitulée conclusions générales-discussion, nous porterons une attention particulière sur les avancées réalisées dans le domaine de la connaissance de l'immunité au cours du développement de *C. gigas* et les perspectives qu'offre ce travail.

## **SECONDE PARTIE : RESULTATS**

## **CHAPITRE I**

**Etude de l'expression des gènes potentiellement impliqués dans l'immunité  
au cours de l'ontogenèse chez l'huître, *Crassostrea gigas***

## Chapitre I

### Etude de l'expression des gènes potentiellement impliqués dans l'immunité au cours de l'ontogénèse chez l'huître, *Crassostrea gigas*

**Publication 1:** The two *Cg-timp* mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.*, 2005, **29**: 831-839.

**Publication 2:** Expression of immune-related genes in the Oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.*, 2007, In press, DCI-D-06-00187.

**Résultats complémentaires:** Analyse de l'expression de gènes potentiellement impliqués dans l'immunité au cours du développement chez *Crassostrea gigas* après mise en contact avec un milieu de culture stérile et des bactéries tuées.

Actuellement la culture d'huître reste majoritairement basée sur le captage du naissain en milieu naturel, cependant la demande de naissain produit en éclosion augmente chaque année. Leur environnement aquatique est riche en microorganismes tels que les protozoaires, microalgues, champignons, levures, bactéries et virus. Des différences de susceptibilité ont été observées entre les différents stades de développement de l'huître avec une fragilité variable en fonction des pathogènes. Indépendamment des bonnes pratiques de culture et de l'utilisation de moyens de prophylaxie adéquates, peu de mesures peuvent être prises pour empêcher les mortalités. Dans un tel contexte, la compréhension de la réponse immunitaire de l'hôte contre les microorganismes est de première importance. Jusqu'alors les recherches sur l'immunité ont été focalisées chez l'huître adulte (Bachère et al., 2004), les connaissances sur les mécanismes de défense aux premiers stades du cycle de vie des huîtres restant encore fragmentaires.

Le premier chapitre de cette thèse est focalisé, au cours du développement de l'huître, du stade ovocyte au stade naissain, sur l'expression de gènes étudiés et montrés potentiellement impliqués dans l'immunité chez l'huître adulte. Les premiers travaux ont consisté à étudier le profil d'expression de deux transcrits de *Cg-timp* « Tissue Inhibitor Metalloproteinase » (TIMPs) au cours de l'ontogénèse. Les TIMPs sont impliqués dans de nombreux processus allant du remodelage des tissus à la croissance, au changement morphologique et à la

migration des cellules (Brew et al., 2000). Ainsi, les TIMPs peuvent avoir des implications dans beaucoup de processus physiologiques, dont l'immunité. Chez l'huître, *Cg-Timp* est exprimé spécifiquement dans les hémocytes, cellules clés de la réponse immunitaire. L'abondance des transcrits est augmentée après cassure de la coquille et stimulation avec des bactéries qui suggèrent une forte implication de *Cg-timp* dans les mécanismes de réparation et de défense (Montagnani et al., 2001). Chez l'huître adulte, les deux transcrits *Cg-timp* isolés s'exprimaient de façon relativement constante quelles que soient les conditions d'expérimentation, alors qu'au cours du développement une expression différentielle est observée. Les résultats suggèrent que *Cg-timp 1.1* n'est pas exprimé au cours du développement (ou en dessous du seuil de sensibilité). Les transcrits de *Cg-timp 1.3* ont été détectés dans les deux premiers stades, ovocytes et le stade 2-4 cellules, faiblement dans les larves D, veligères et de 7 jours et plus abondamment dans les larves de 22 jours, juste avant la métamorphose. Ces résultats peuvent révéler une implication distincte de ces 2 gènes *Cg-Timp* au cours du développement.

La seconde partie de ce chapitre est focalisée sur l'analyse de l'expression de 18 gènes potentiellement impliqués dans l'immunité, au cours du développement. Les profils d'expression des gènes ont montré que les ARNm détectés dans les 2 premiers stades (ovocytes et 2-4 cellules) sont d'origine maternelle et que la transcription commence quelques heures après la fécondation. L'analyse de l'expression quantitative des gènes *Cg-timp*, *Cg-tal*, *Cg-EcSOD* « Extracellular Superoxide Dismutase » et *Drac3*, suggère que les hémocytes apparaissent aux stades gastrula-trochophore puisque ces gènes s'expriment spécifiquement dans les hémocytes chez l'huître adulte (Montagnani et al., 2001, Barreau-Roumiguière et al., 2003, Gonzalez et al., 2005). De plus *Cg-Tal* et *Drac3* sont des marqueurs d'hémocytes ou de leurs cellules précurseur chez d'autres espèces (Porcher et al., 1996; Sasamura et al., 1997). La localisation de l'expression de *Cg-tal* suggère que les cellules hématopoïétique pourraient être dérivées des cellules endothéliales des vaisseaux comme cela a été démontré chez des vertébrés (Jaffredo et al., 2005). Finalement, nous avons montré qu'un challenge avec des bactéries non-pathogènes affecte de l'expression de certains gènes. En effet, une modification du niveau d'expression des gènes *Cg-LBP/BPI*, « Lipopolysaccharide Binding Protein/Bactericidal-Permeability Increasing Protein, Gueguen et al. 2003 », *Cg-timp*, *Drac3* et *Cg-MyD88* « Myeloid differentiation factor 88 » a été observée dans les stades larvaires. Dans le naissain une modulation de l'expression des gènes *Cg-LBP/BPI*, *Cg-timp*, *Cg-MyD88* et *Cg-tal* a aussi été observée dépendante de la quantité de bactéries utilisée pour le challenge.

Un dernier point concerne un complément de résultats sur l'expression de ces gènes après exposition des individus (baignade) à du milieu de culture stérile et des bactéries tuées.

Ces résultats montrent qu'au cours du développement le système immunitaire se met progressivement en place et que les animaux deviennent aptes à répondre aux stress, le profil d'expression des gènes étant variable en fonction du stade de développement, des conditions de stress. En effet l'apparition des hémocytes, cellules immunocompétentes, est suivie par leur capacité à exprimer des gènes immunitaires. Ces données représentent une base pour mieux comprendre l'ontogenèse du système immunitaire de l'huître.



## Short communication

## The two *Cg-timp* mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis

Caroline Montagnani<sup>1</sup>, Ana Tirape, Viviane Boulo, Jean-Michel Escoubas\*

*Génome, Populations, Interactions, Adaptation (GPIA), UMR5171 (IFREMER, CNRS, UMII) Université de Montpellier II, place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier, France*

Received 18 January 2005; revised 22 February 2005; accepted 28 February 2005

Available online 21 March 2005

---

**Abstract**

We previously characterized a *Crassostrea gigas* tissue inhibitor of metalloproteinase (*Cg-timp 1.3*) with potential role in wound healing and defense mechanisms. Here we isolated a second cDNA (*Cg-timp 1.1*) encoding a protein that contains the characteristic signature of TIMP proteins. Sequence analysis of the two transcripts showed that they originate from two distinct genes. The two proteins, *Cg-TIMP 1.1* and *1.3*, are closely related and share 81% identity. Northern blot analysis of *Cg-timp* gene expression in adult oyster hemocytes indicated that the ratio between the two transcripts was constant from one oyster to another (*Cg-timp 1.1* and *1.3* represent 32 and 68%, respectively). Conversely, during ontogenesis the expression pattern of the two *Cg-timp* genes was different. Indeed, *Cg-timp 1.3* mRNAs were detected from the larval D stage whereas *Cg-timp 1.1* transcripts were undetectable up to 22 days post-fertilization. The difference in expression pattern of the two *Cg-timp* genes may reveal distinct implications of these genes in the embryos and larvae developments.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Oyster; *Crassostrea gigas*; Mollusk immunity; cDNA cloning; Gene expression; Hemocyte; Ontogenesis

---

**1. Introduction**

The extracellular matrix (ECM) consists of a complex combination of structural and functional

macromolecules that holds tissues together and forms lattices for cellular interactions. Timely degradation of the ECM is therefore crucial for controlling cellular differentiation, migration, or growth that are required during diverse tissue remodeling events of embryonic and postnatal development, and in adult remodeling processes such as wound repair and angiogenesis [1,2]. The major enzymes that are involved in these processes are the members of the MMP family, a family of zinc-dependant endopeptidases that catalyses the turnover of ECM components. The activities of MMPs are controlled by endogenous inhibitors

---

\* Corresponding author. Address: Écologie Microbienne des Insectes et Interactions Hôte-Pathogène (EMIP), UMR1133 (INRA, UMII) Université de Montpellier II, 2 place E. Bataillon, CC54, 34095 Montpellier, France. Tel.: +33 4 67 14 47 11; fax: +33 4 67 14 46 79.

E-mail address: [jmescoubas@univ-montp2.fr](mailto:jmescoubas@univ-montp2.fr) (J.-M. Escoubas).

<sup>1</sup> Present address: Australian Institute of Marine Science, PMB 3, Townsville, Qld 4810, Australia.



called TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase) [3]. The local balance between MMPs and TIMPs is believed to play a major role in extracellular matrix remodeling thus playing a role in a wide range of physiological events.

In vertebrates, TIMPs form 1:1 enzyme–inhibitor complexes. Four TIMP families are currently identified in mammals (TIMP-1, -2, -3 and -4) and all of them share several structural features [4]. They are homologous proteins of 21–29 kDa containing a leader sequence which is cleaved off upstream from the motif Cys-X-Cys (where X designate any amino acid), to produce the mature protein. They all possess 12 cysteine residues in conserved regions of the molecule, forming six disulfide bonds and dividing the protein in two parts, an amino terminal inhibitory domain and a carboxyl terminal domain involved in specific interactions with MMPs.

*Timp* genes are also present in invertebrates, such as *Drosophila melanogaster* [5], *Crassostrea gigas* [6], *Anopheles gambiae* (Accession numbers XP\_314215 and XP\_319551), *Caenorhabditis elegans* (Accession numbers NP\_505113 and NP\_505115) and *Cucumaria frondosa* (Accession numbers AAK61535). Disruption of *Timp* gene in *Drosophila* resulted in inflated wings, tissue autolysis and early death [7]. Furthermore, in vitro analysis revealed that *Drosophila* TIMP is a potent inhibitor of MMPs [8]. These results suggest that in *Drosophila*, as in vertebrates, TIMP is involved in ECM turnover and cell-matrix adhesion.

The only other invertebrate *timp* studied so far is *Cg-timp* from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. We demonstrated that *Cg-timp* was only expressed in oyster hemocytes which are the cellular components that mediate bivalve mollusk immunity. Moreover, *Cg-timp* mRNAs were shown to accumulate in hemocytes of oysters submitted to shell damage or bacterial challenge, suggesting the involvement of *Cg-TIMP* in wound healing as well as in defense mechanisms [6]. Interestingly, Northern blot analysis revealed the presence of two transcripts expressed in oyster hemocytes. A first one was at the expected size (1.3 kb) according to the cDNA characterized and the other one was of a lower size (1.1 kb) and from unknown origin.

This work was designed to characterize the later *Cg-timp* transcript and to compare the expression

pattern of the two *Cg-timp* mRNAs, hereafter referred to as *Cg-timp 1.3* and *Cg-timp 1.1*. We showed that *Cg-timp* transcripts are both expressed in individual oyster in a conserved ratio. Molecular cloning of *Cg-timp 1.1* cDNA revealed that the two *Cg-timp* transcripts differ mainly on their UTRs and that the ORFs are well conserved (84.6% identity). The amino acid sequence deduced from the two cDNAs revealed that both proteins possess the characteristic organization of TIMP proteins and are closely related (81% identity). The analysis of *Cg-timp 1.1* and *1.3* expression pattern during early developmental stages revealed that the two transcripts are differentially expressed. Our results show that the two transcripts originate from two different genes and suggest that the differential *Cg-timp* expression patterns may rely on different specificities and follow the morphologic changes and tissue remodeling that occurs during ontogenesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Oysters, shell damage and hemolymph withdrawal

Three- to four-years-old oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) were collected from a commercial farm (Palavas, Gulf of Lion, France), and kept in seawater at 15 °C. Expression of *Cg-timp* was induced by damaging oyster shell as previously described [6]. Then, oysters were returned to seawater tanks and kept for 15 h before hemolymph collection. Oyster hemolymph was collected with a syringe from the pericardial cavity, through the adductor muscle, and immediately centrifuged at 1000g for 10 min at 4 °C. Hemocyte pellets were used for RNA extraction.

### 2.2. Embryos and larvae

Oyster embryos and larvae, at different developmental stages, were produced at the IFREMER hatchery in La Tremblade (France) from wild broodstocks collected in the Marennes-Oléron Bay. Oyster rearing was performed at 23 °C and the following stages were collected: oocytes, 2–4 cell stage embryos (1 h post-fertilization), morula (2 h), blastula (3.5 h), gastrula (6.5 h), trochophore larvae (14 h), D-hinged

larvae (24 h), veliger larvae (45 h), larvae aged of 7 and 22 days (just before metamorphosis).

### 2.3. RNA isolation and analysis

Hemocytes or embryos and larvae at the different developmental stages were resuspended in Trizol™ reagent (1 ml of reagent per 10<sup>7</sup> cells or per 100 mg of embryos or larvae) and total RNAs were extracted following manufacturer's instructions. Total RNAs (10 µg per lane for hemocytes and 30 µg per lane for embryos or larvae) were separated by denaturing 1.2% agarose/formaldehyde gel electrophoresis, and blotted onto Hybond-N membranes (Amersham Pharmacia Biotech). Size markers were simultaneously applied to the electrophoresis and visualized by staining the membrane with a methylene blue solution. Membranes were prehybridized for 2 h at 65 °C in 50% formamide, 5× sodium saline citrate (SSC), 1% *N*-lauryl sarcosine and 2.5% blocking reagent (Roche Molecular Biochemicals). Hybridizations were performed overnight at 42 °C in the same buffer containing the radiolabeled probe. After hybridization, membranes were washed twice for 15 min at room temperature in 2×SSC containing 0.1% SDS and twice for 20 min at 60 °C in 1×SSC containing 0.1% SDS. Finally, membranes were exposed to autoradiographic films. Signal intensities were quantified using the Storm system technology from Molecular Dynamics.

### 2.4. Probes preparation

To synthesize the full length *Cg-timp* probe, we used a 1301 bp cDNA fragment coming from the hydrolysis

of *Cg-timp* plasmid by restriction enzymes *EcoRI* and *XhoI*. In order to synthesize probes specific either to the UTRs or to the ORF, we used five sense and five antisense primers along the *Cg-timp 1.3* cDNA and two vector primers (Table 1). These primers were combined in pairs (T3/IMP2, 1s-2as, 2s-3as, 3s-4as, 4s-5as, and JME4/T7) in six PCR reactions using *Cg-timp 1.3* plasmid as template. We obtained six PCR products ranging from 161 to 571 bp totally overlapping *Cg-timp 1.3* sequence. The *Cg-timp 1.1* specific probe was obtained by PCR using JME4 and T7 as primers and *Cg-timp 1.1* plasmid as template (347 bp long amplicon). PCR reactions were carried out in 50 µl according to the standard conditions of the Promega Taq DNA polymerase. After DNA denaturation at 94 °C for 3 min, 30 cycles were run with an MJ-Research thermocycler as follows: denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 30 s followed by a final 72 °C elongation step of 10 min. Amplified products were analyzed electrophoretically on 1% agarose gels. Ribosomal RNA probe was prepared as previously described [9]. The PCR products and cDNA were purified and radiolabeled ([ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP) using the random priming kit from Invitrogen™.

### 2.5. Screening of the hemocyte cDNA library

A cDNA library was generated from challenged-oyster hemocytes as previously described [10]. Then, a total of 55,000 colonies were randomly picked, rearranged in 384-well plates and spotted on three high density filters. Filters were prehybridized for 20 h at 65 °C in 5×Denhardt's, 5×SSPE, 1% SDS and 100 µg/ml salmon sperm DNA. Hybridizations were

Table 1  
Sequences and combinations of primers used to synthesize probes

Probe <sup>a</sup>	Primer	Position <sup>b</sup>	Sequence (5'-3')	Primer	Position <sup>b</sup>	Sequence (5'-3')	PCR product size (bp)
5'UTR	T3	Vector	aattaaccctcactaaaggg	IMP2	171–154	ctcatcgtctcctggggg	256
A	1 s	166–185	gatgaggcagtacaactcc	2 as	345–324	gaatacccttgcactcgtcc	180
B	2 s	325–344	gacgagtcfaatgggtattcc	3 as	524–504	cgccgtcactgacaacc	200
C	3 s	505–524	aggttttgtcagtgacggcg	4 as	688–669	cgccgtcactgacaacc	184
D	4 s	669–688	cattgaatccggaccagacc	5 as	829–810	cggtagaaccctcctctccc	161
3'UTR	JME4	830–847	gaaccaaaccagctggc	T7	Vector	gtaatacgtcactatagggc	571

<sup>a</sup> Probe name according to Fig. 2.

<sup>b</sup> Position according to *Cg-timp 1.3* cDNA sequence (GenBank accession number AF321279).

performed overnight at 65 °C in the same buffer containing the full length *Cg-timp* probe. After hybridization, membranes were washed twice for 20 min at 65 °C in 1×SSC containing 0.1% SDS and twice for 15 min at 65 °C in 0.5×SSC containing 0.1% SDS. Finally membranes were exposed to autoradiographic films.

### 3. Results

#### 3.1. *Cg-timp* expression in individual oysters

Previous Northern blot analysis of *Cg-timp* expression revealed that hemocytes contained two *Cg-timp* mRNAs [6]. One, *Cg-timp 1.3*, was the expected size (1.3 kb) according to the *Cg-timp* cDNA characterized (AF321279) and the other one, *Cg-timp 1.1*, was of lower molecular mass (1.1 kb). However, in all the Northern blots realized so far, RNAs were extracted from hemocytes originated from a pool of at least 10 oysters. Consequently, two hypotheses may explain the presence of the two transcripts in oyster hemocytes, either each individual oyster expressed only one of the two transcripts, or each oyster expressed both of them. To investigate these hypotheses, Northern blot analysis were carried out using total RNAs extracted from eight individual oysters and probed with the full length *Cg-timp* (Fig. 1). We observed that the two transcripts were expressed in each animal. Moreover, the Northern blot revealed that there was a large discrepancy in *Cg-timp* (*1.1* and *1.3*) transcripts abundance from one oyster to another. Indeed, Northern blot signal quantifications using

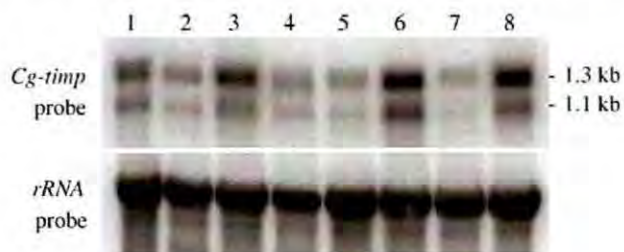


Fig. 1. Northern blot analysis of *Cg-timp* gene expression using total RNAs isolated from hemocytes of eight individual shell damaged oysters. Blot containing 10 µg of total RNAs per lane was successively hybridized with *Cg-timp* probe and *rRNA* probe to verify RNA loading.

the Storm system revealed that *Cg-timp* mRNAs were 11 times more abundant in oyster 6 than in oyster 7 (after normalization to the level of rRNAs). Conversely the ratio between the two *Cg-timp* transcripts (*1.1* versus *1.3*) was conserved between oysters and *Cg-timp 1.1* represents 31.6% ( $\pm 4.4\%$ ) of total *Cg-timp* mRNAs (*Cg-timp 1.1* plus *1.3*).

#### 3.2. Origin of the two *Cg-timp* mRNAs

The synthesis of two *Cg-timp* transcripts in oyster hemocytes may be explained by the presence of two genes or by differential splicing of one gene product. To investigate the differences between the two transcripts we realized a Northern blot in which total RNAs extracted from a pool of oyster hemocytes were run on six independent lanes. Each lane was hybridized with one of the six probes specific either to the UTRs or to the different parts of the ORF (Fig. 2). We observed that all the probes used hybridized with *Cg-timp 1.3* whereas *Cg-timp 1.1* was only recognized by the probes A, B and D. The fact that the two *Cg-timp* transcripts differ by their UTRs suggest that they are transcribed from two different genes.

#### 3.3. Molecular cloning of *Cg-timp 1.1* cDNAs

The oyster hemocyte cDNA library was screened using the full length *Cg-timp* probe. Among the 55,000 cDNAs screened, 850 clones were lighted by the probe suggesting that *Cg-timp* mRNAs constitute

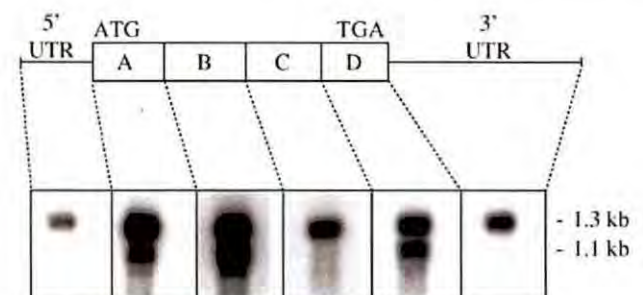


Fig. 2. Northern blot analysis of the two *Cg-timp* transcripts. The upper part of the figure schematizes *Cg-timp* cDNA and shows the portions used to synthesize probes. The lower part corresponds to a Northern blot analysis of *Cg-timp* gene expression using total RNAs (10 µg per lane) isolated from hemocytes withdrawn from shell damaged oyster. Each lane was hybridized with one of the five probes schematized in the upper panel (see also Table 1).

Table 2  
Nucleotide sequences comparison between the different *Cg-timp* clones isolated

Percentage of identity between clones	5' UTR (%)	ORF (%)	3'UTR (%)
<i>Cg-timp 1.1</i> (4 clones)	87.5	96	92
<i>Cg-timp 1.3</i> (3 clones)	90	96.7	92
<i>Cg-timp 1.1</i> and <i>Cg-timp 1.3</i> <sup>a</sup>	50	84.6	36

<sup>a</sup> GenBank accession numbers of *Cg-timp 1.1* and *1.3* are AY659986 and AF321279, respectively.

1.5% of whole hemocytes transcripts. This value was in agreement with the results obtained during the EST program were 19 ESTs over 1142 analyzed (1.7%) corresponded to *Cg-timp* [10]. A differential screening was realized on 96 out of the 850 clones using the full length *Cg-timp* probe and the 3'UTR specific probe. Four clones which did not hybridize with the 3'UTR specific probe were sequenced, the sizes of which ranged from 820 to 1063 bp. Most of the differences between the four clones occurred within the two UTRs whereas the ORFs were highly conserved (96% identity), as previously observed for *Cg-timp 1.3* (Table 2) [6]. According to the Northern blot analysis, the 1063 pb long clone seems to be a full length cDNA, and we decided to focus on it, referred

thereafter as *Cg-timp 1.1*, for further studies (GenBank accession number AY659986). Nucleotide sequences comparison between *Cg-timp 1.1* and *1.3* showed that the UTRs were poorly conserved and that the ORFs shared 84.6% identity (Table 2). Sequences alignments between each ORF segment (A, B, C, and D) of *Cg-timp 1.1* and *1.3* showed that identities shared by A, B and D segments ranged from 85 to 92% whereas segment C only shared 74% identity. Sequence alignment analyses are in agreement with Northern blot results presented in Fig. 2. Altogether, these data confirm that the two *Cg-timp* transcripts originate from two different genes.

### 3.4. Comparison of the proteins encoded by the two *Cg-timp* genes

The protein encoded by *Cg-timp 1.1* (*Cg-TIMP 1.1*) contains hallmarks of vertebrate TIMP proteins. That is to say, a leader sequence which is cleaved off upstream of the motif Cys-X-Cys (where X designates any amino acid), and 12 cysteine residues at conserved positions and spacings within the molecule [3]. Compared to vertebrates, *Cg-TIMP 1.1* as well as *Cg-TIMP 1.3* has two additional cysteine residues in the carboxyl terminal domain of the protein (Fig. 3) [6].

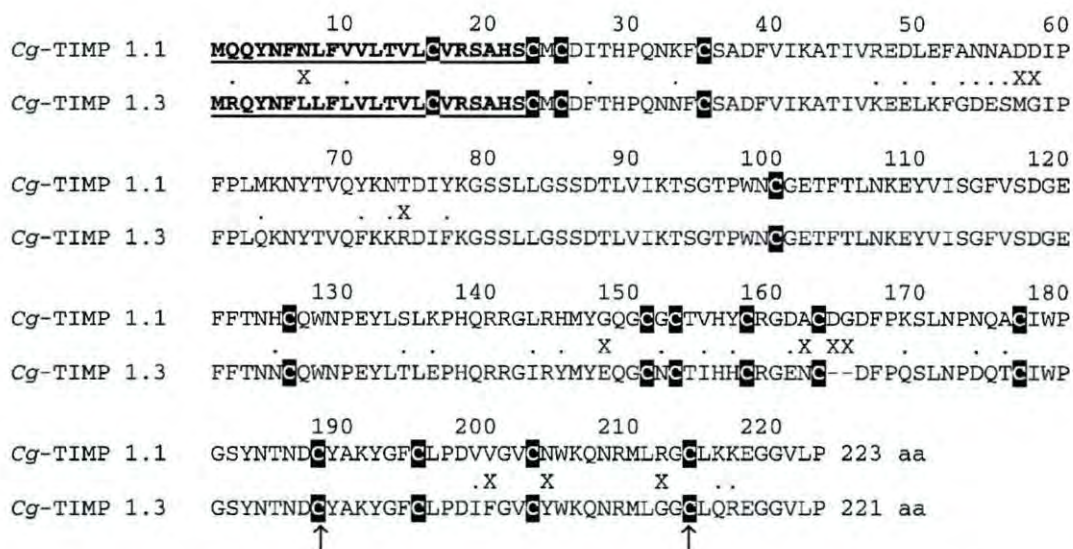


Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences deduced from *Cg-timp 1.1* and *1.3* cDNAs. Signal peptides revealed by SignalP 3.0 software are in bold and underlined (predicted cleavage sites located between residues 22 and 23). Cysteine residues are written in white on black background. Vertical arrows indicate the additional pairs of cysteine residues, compared to vertebrates, in the carboxyl terminal domain of oyster TIMPs. Crosses indicate differences and dots represent conservative substitutions between the corresponding pair of amino acid residues. Two gaps were introduced into the sequence of *Cg-TIMP 1.1* to optimize the alignment.

The *Cg-TIMP 1.1* and *1.3* proteins share 81% identity and have a closely related predicted molecular mass (22.6 and 22.7 kDa, respectively) but despite *Cg-TIMP 1.3*, *Cg-TIMP 1.1* contains a two amino acid insertion in its carboxyl terminal domain (position 163). Moreover, *Cg-TIMP 1.1* has an isoelectric point markedly different from the one of *Cg-TIMP 1.3* (6.9 and 5.6, respectively). Interestingly, *Cg-TIMP 1.3* seems to be an exception since all TIMPs proteins described so far in vertebrates but also in *Drosophila* have a neutral or basic isoelectric point comprised between 6.8 and 9.7.

### 3.5. Expression pattern of *Cg-timp* genes during ontogenesis

Analysis of *Cg-timp* genes expression pattern revealed that, in adult oysters, the two genes are only expressed in hemocytes and up regulated during shell damage and bacterial challenge. In all these conditions the relative expression between the two genes was almost constant (1/3 *Cg-timp 1.1* and 2/3 *Cg-timp 1.3*) ([6] and data not shown). As mentioned before, TIMPs play a critical role in matrix remodeling during early development in vertebrates and *Drosophila* [11,7]. To address the question of the relative expression of *Cg-timp* genes during

ontogenesis, we undertook Northern blot analysis on RNAs extracted from ten different developmental stages.

To discriminate between the expression of the two genes, the blot was successively hybridized with the 3'UTR specific probes for *Cg-timp 1.1* and *1.3* (probe sizes were 347 and 571 bp, respectively). We only observed a faint signal in the 22 days larvae hybridized with the *Cg-timp 1.3* specific probe (data not shown). According to the difference of the level of expression between the two genes observed in adults and the small size difference between the two transcripts, we assumed that in these conditions the sensitivity of the technique could have been insufficient to detect *Cg-timp 1.1* expression. We then decided to use a longer common probe overlapping the entire ORF sequence (663 bp cDNA derived from PCR amplification using 1 s and 5as primers). After 30 h exposure, a faint signal of *Cg-timp 1.3* probe hybridization was once again only detected in the RNAs extracted from the 22 day larvae although the two transcripts were detected in RNAs extracted from adult hemocytes (Fig. 4). After a 4 days of exposure, *Cg-timp 1.1* transcripts were still undetectable whereas *Cg-timp 1.3* transcripts were observed in RNAs extracted from oocytes, 2–4 cell embryos, and larvae (D shaped, veliger, 7 and 22 days) (Fig. 4).

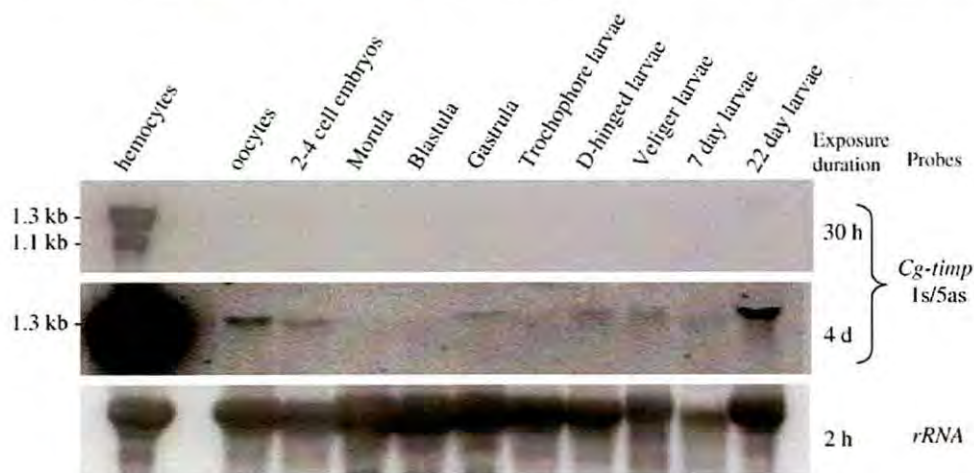


Fig. 4. Northern blot analysis of the two *Cg-timp* transcripts during oyster ontogenesis. Oyster rearing was performed at 23 °C and the following stages were collected: oocytes, 2–4 cell stage embryos (1 h post-fertilization), morula (2 h), blastula (3.5 h), gastrula (6.5 h), trochophore larvae (14 h), D-hinged larvae (24 h), veliger larvae (45 h), larvae aged of 7 days and 22 days (just before metamorphosis). Total RNAs isolated from larvae at various developmental stages were separated on denaturing gel simultaneously with RNAs extracted from adult oyster hemocytes (used as control to verify the presence of the two *Cg-timp* transcripts). Blot containing 30 µg of total RNAs per lane was successively hybridized with *Cg-timp* probe (1 s/5as), and *rRNA* probe to verify RNA loading.

These results suggest that the *Cg-timp 1.1* was not expressed during early development (or under the threshold of sensibility). *Cg-timp 1.3* transcripts detected in oocytes but also in the 2–4 cell stages correspond to maternal RNAs since in mollusks the transcription starts at the compacted morula stage. *Cg-timp 1.3* transcripts were faintly detected in D-hinged, veliger and 7 day larvae whereas they were more abundant in 22 day larvae, just before metamorphosis, a developmental stage where most of the oyster tissues are reorganized.

#### 4. Discussion

We previously reported that oyster hemocytes were expressing two *Cg-timp* transcripts (1.1 and 1.3 kb), whereas *Cg-timp 1.3* cDNA was characterized, the origin of 1.1 kb transcript was unknown [6]. We report here the characterization of the *Cg-timp 1.1* cDNA, the demonstration that the two mRNAs (1.1 and 1.3) were produced in each individual oyster and that they originated from two genes or gene families. These results are consistent with the work of Sharbel and co-workers who identified at least five different *Cg-timp* loci which have arisen via multiple duplications of a common ancestral gene motif (submitted to publication). We observed that in adult oysters, the relative transcript abundance was almost constant (1/3 *Cg-timp 1.1* and 2/3 *Cg-timp 1.3*). We hypothesize that the gene copy number in each family (1.1 and 1.3) may explain the difference in *Cg-timp 1.1* and 1.3 transcript ratio.

Comparison of amino acid sequences deduced from the cDNAs revealed that the two proteins share 81% identity. The similarities shared by the two *Cg-TIMPs* were significantly higher than those observed in vertebrate TIMPs. Indeed, in human four TIMPs have been characterized and TIMP-2 and -4, which shared the highest similarities, have only 48% identity [12]. These observations suggest that the two oyster *Cg-TIMPs* are too similar to be separated in categories like vertebrate TIMPs. However, the similarities between *Cg-Timp 1.1* and 1.3 are slightly higher in the N-terminal than in the C-terminal part of the proteins (84 and 78% identity, respectively). According to the functional domain arrangement of vertebrate TIMPs, specifically that the N-terminal domain is

responsible for MMP inhibition whereas C-terminal domain is most important to mediate the specific functions of the molecule [13,1], we can speculate that the two oyster TIMP proteins have different specificities. This hypothesis is supported firstly, by the markedly different isoelectric points of the two proteins especially in their C-terminal part (8.2 and 6.0 for *Cg-Timp 1.1* and 1.3, respectively), and secondly by the fact that *Cg-timp 1.1* was undetectable during embryonic development (at least until 22 days old larvae), whereas *Cg-timp 1.3* appears at the larval D stage.

For the study of *Cg-timp* expression we focused on the pelagic period of oyster life cycle, characterized by the motility of the animal. This period goes from the fertilization to the settlement of the pediveliger larva (around 22 days post-fertilization). During this period embryos undergo cell division until they reach the trochophore larval stage (10–20 h post-fertilization) without growing and feeding. The next stage, D-hinged larva, begins with shell production and velum formation and is followed by the veliger stage which feature characteristic is the presence of the velum. The velum functions as an organ for both swimming and capturing food particles [14,15]. It is interesting to note that *Cg-timp* expression was concomitant to the beginning of larvae growing and feeding and was more pronounced at the pediveliger stage, when larvae develop a foot and become competent to metamorphose.

Metamorphic changes are of two types; (i) the larval structures resorption (larval foot, velum, and eye spot disappear) and (ii) permanent structures rearrangement, two phenomena that necessitate profound ECM remodeling. These observations suggest that *Cg-timp* expression during oyster ontogenesis pressed extensive tissue generation and remodeling processes which are, in other organisms, mainly controlled by proteases of the MMP family and their inhibitor TIMP [16,11].

In conclusion, the two transcripts expression pattern may reveal different role on the embryo development and dismantling of the larvae structure during metamorphosis. Indeed, MMPs and TIMPs are dynamically expressed in a cell-specific manner and a differential pattern of expression of *Cg-timp* transcripts could be associated with the activity of

different MMPs at different time during tissue remodeling.

Moreover, one of them might play a different role since TIMPs/MMPs can also control cellular behavior in the remodeling tissue by their capacity to activate cytokines and growth factors and increase their bioavailability [17,18]. It seems that these capacities would also be very important, considering that tissue resorption does not involve wholesale destruction, but occurs in an orderly manner with the progressive erection and dismantling of several scaffolds. This gradual remodeling process may also explain the differential expression of *Cg-timps* with different specificities during ontogenesis. Further study will have to determine *Cg-TIMPs* targets and whether a causal relationship exists between *Cg-timps* expression and larval tissue remodeling and development.

Nevertheless, we previously described that in adult oysters *Cg-timp* was only expressed in hemocytes. Therefore, we could not exclude that the apparition of *Cg-timp* transcripts during oyster early development may correspond to the differentiation of hemocytes in larvae. Molluscan hemocytes are involved in many functions, including digestion and nutrient transport, wound healing, shell repair, excretion, and internal defenses [19]. In larvae, Elston described the presence of phagocytic cells attached to all surface of visceral cavity [20]. The visceral cavity appears in veliger larvae and is a fluid-filled chamber delimited dorsally and laterally by the mantle, and ventrally by the velum. The visceral cavity has many functions: it provides a fluid medium for free phagocytic cells and also provides space for the rapid growth of the organs of the digestive system.

Thus, the presence of *Cg-timp* transcripts at the D-hinged or veliger larval stages might rely on the presence of the first hemocytes in the animals, cells that may be necessary to ensure larval growing, feeding and defense by providing molecules involved in phagocytosis and tissue remodeling. The study of the expression of hemocyte specific markers, like *Cg-MMP* (a matrix metalloprotease-like molecule, [10]) and *Cg-tal* (a transcription factor of the Tal1/SCL family, [9]), should help elucidate the relationship between the apparition of hematopoietic cells and molecules involved in tissue remodeling and defense mechanisms.

## Acknowledgements

We thank M. Leroy for technical assistance. We also thank R. Brizard and P. Phelipot (IFREMER, La Tremblade) for technical assistance in the production of embryos and larvae. This work was supported by the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), the University of Montpellier 2 as well as the MOREST national project funded by Ifremer (institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer), the Région Basse-Normandie Bretagne, Pays de la Loire and Poitou-Charentes and the Conseil général du Calvados.

## References

- [1] Nagase H, Brew K. Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res* 2002;4(3):51–61.
- [2] Wei L, Shi Y-B. Matrix metalloproteinase stromelysin-3 in development and pathogenesis. *Histol Histopathol* 2005;20: 177–85.
- [3] Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477(1–2):267–83.
- [4] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74(2):111–22.
- [5] Pohar N, Godenschwege TA, Buchner E. Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human. *Genomics* 1999;57(2):293–6.
- [6] Montagnani C, Le Roux F, Berthe F, Escoubas J-M. *Cg-TIMP*, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Lett* 2001;500(1–2): 64–70.
- [7] Godenschwege TA, Pohar N, Buchner S, Buchner E. Inflated wings, tissue autolysis and early death in tissue inhibitor of metalloproteinases mutants of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* 2000;79(7):495–501.
- [8] Wei S, Xie Z, Filenova E, Brew K. *Drosophila* TIMP is a potent inhibitor of MMPs and TACE: similarities in structure and function to TIMP-3. *Biochemistry* 2003;42(42):12200–7.
- [9] Barreau-Roumiguère C, Montagnani C, Escoubas J-M. Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 2003; 27:793–800.
- [10] Gueguen Y, Cadoret J-P, Flament D, Barreau-Roumiguère C, Girardot A-L, Garnier J, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 2003; 303:139–45.

- [11] Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett* 2004;563(1–3):129–34.
- [12] Leco KJ, Apte SS, Taniguchi GT, Hawkes SP, Khokha R, Schultz GA, et al. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 1997;401(2–3):213–7.
- [13] Langton KP, Barker MD, McKie N. Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation. *J Biol Chem* 1998;273(27):16778–81.
- [14] Kennedy VS. Biology of larvae and spat. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF, editors. *The eastern oyster Crassostrea virginica*. College Park: Maryland Sea Grant College; 1996. p. 371–421.
- [15] Thompson RJ, Newell RI, Kennedy VS, Mann R. Reproductive processes and early development. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF, editors. *The eastern oyster Crassostrea virginica*. College Park: Maryland Sea Grant College; 1996. p. 335–70.
- [16] Page-McCaw A, Serano J, Sante JM, Rubin GM. Drosophila matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev Cell* 2003;4(1):95–106.
- [17] Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1997;139(7):1861–72.
- [18] Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14(2):163–76.
- [19] Cheng TC. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF, Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF, editors. *The eastern oyster Crassostrea virginica*. College Park: Maryland Sea Grant College; 1996. p. 299–333.
- [20] Elston R. Functional morphology of the coelomocytes of the larval oysters (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*). *J Mar Biol Assoc* 1980;60:947–57.





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology ■ (■■■■) ■■■-■■■

[www.elsevier.com/locate/devcompimm](http://www.elsevier.com/locate/devcompimm)**Developmental  
& Comparative  
Immunology**

## Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis

Ana Tirapé<sup>a</sup>, Coralie Bacque<sup>a</sup>, Raphaël Brizard<sup>b</sup>,  
Franck Vandenbulcke<sup>c</sup>, Viviane Boulo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>UMR5171, IFREMER, CNRS, UMII, Génome Populations Interactions Adaptation (GPIA), Université de Montpellier II,  
2 Place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier Cedex 5, France

<sup>b</sup>IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade 17390, France

<sup>c</sup>Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie, EA 3570, Université de Lille 1, Cité Scientifique, Bâtiment SN3,  
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 17 October 2006; received in revised form 3 January 2007; accepted 3 January 2007

### Abstract

The work presented here reports the expression of immune-related genes during ontogenesis in the oyster *Crassostrea gigas*. Expression patterns of 18 selected genes showed that RNAs detected in oocytes and 2–4 cell embryos are of maternal origin and that gene transcription starts early after fertilization. The expression patterns of 4 genes (*Cg-timp*, *Cg-tal*, *Cg-EcSOD* and *Drac3*) suggested that hemocytes appear in the gastrula-trochophore stages. The localization of *Cg-tal* expression suggested that hematopoietic cells were derived from vessels and/or artery endothelia cells. Moreover, a bacterial challenge affected the level of expression of genes. Indeed, a change in expression levels was observed for *Cg-LBP/BPI*, *Cg-timp*, *Drac3* and *Cg-MyD88* genes in larval stages upon exposure to non-pathogenic bacteria. In early juveniles, a modulation was also observed for *Cg-LBP/BPI*, *Cg-timp*, *Cg-MyD88* and for *Cg-tal*, according to the concentration of bacteria. Altogether, the results showed that studying the appearance of immunocompetent cells through their ability to express immune-related genes is a tool to gain insight the ontogenesis of the oyster immune system.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Bivalve mollusk; Hemocytes; Mollusk immunity; Hematopoiesis; Cell proliferation; Rel/NF- $\kappa$ B pathway

### 1. Introduction

In adult mollusks, the immune system is based on an innate system [1–3]. The internal defense mechanisms can be split into cell-mediated and humoral mechanisms: it has become increasingly apparent that both are interrelated and closely

associated with hemocytes, which are the main immunocompetent cells [4–7]. Hemocyte populations in bivalve mollusks have been the subject of extensive studies but the localization of hematopoietic site(s) remain(s) uncertain. The generally accepted belief is that hemocytes rise from differentiation of connective tissue cells [5].

To gain insight into the immune response in oysters, genomic approaches have been developed and therefore several immune-related genes have been characterized in *Crassostrea gigas*. Escoubas

\*Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 67 14 47 06;  
fax: +33 (0)4 67 14 46 22.

E-mail address: [vboulo@ifremer.fr](mailto:vboulo@ifremer.fr) (V. Boulo).

et al. [8] and Montagnani et al. [9] isolated and characterized two proteins, oIKK (oyster I $\kappa$ B kinase like protein) and *Cg-rel*, which share structural and functional properties with elements of the Rel/NF- $\kappa$ B pathway in vertebrates and in *Drosophila* [10,11]. Moreover, four additional cDNAs of the Rel/NF- $\kappa$ B pathway were isolated including the adapter proteins *Cg-MyD88*, *Cg-ECSIT*, *Cg-TRAF3* and the *Drosophila* homolog to I $\kappa$ B (cactus) [9,12]. Based on homology with the Rel/NF- $\kappa$ B pathway in insects, the function of the Rel/NF- $\kappa$ B pathway in oysters may serve to regulate genes that are involved in innate defense and/or development [10,13]. A transcription factor, Tall/SCL, belonging to the transcription factor class of bHLH (basic helix-loop-helix), has been characterized and has been shown to be specifically expressed in adult oyster hemocytes [14]. Moreover, several effectors have been studied for their potential involvement in the oyster immune response, e.g. *Cg-timp*, a tissue inhibitor of metalloproteinase [15], that is expressed specifically in hemocytes and is inducible after bacterial challenge and shell damage. *Cg-timp* may be an important factor implied in defense mechanism and in wound healing like in Vertebrates [16]. A second effector is *Cg-EcSOD*, an extracellular superoxide dismutase, which is involved in LPS-binding and which is also specifically expressed in hemocytes [17]. In addition, *Cg-def*, *Cg-defh1* and *Cg-defh2* are antimicrobial peptides (defensins) isolated from mantle edge and hemocytes, respectively [18,19]. *Cg-def* showed an unaffected expression following a bacterial challenge, whereas *Cg-defh2* expression was affected.

While, the immune response has been characterized for the oyster adult, so far, during ontogenesis very little is known. At the cellular level, Elston [20] described the presence of phagocytic cells (referred as coelomocytes) in the visceral cavity of veliger larvae in *Crassostrea virginica*. Moreover, Elston and Leibovitz [21] observed motile phagocytes containing bacterial fragments in the visceral cavity, and recorded the extrusion of redundant phagocytes through the velum in oyster larvae (*C. virginica* and *C. gigas*). At the molecular level, only Herpin et al. [22,23] has identified and characterized the transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) superfamily that includes bone morphogenetic proteins (BMPs), activins (*Cg-ALRI*) and TGF- $\beta$  *sensu stricto*. These effectors would play a key role in numerous biological processes including early embryonic development and immune regulation.

In this paper, 18 genes potentially involved in immune system in adult oyster and in other organisms were selected in order to study the immune system during the oyster development. The expression pattern of each gene was analyzed in various development stages of *C. gigas*. The expression level of selected genes was also studied following an experimental bacterial challenge.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Oyster developmental stages

Oysters at various developmental stages were produced at the IFREMER hatchery, La Tremblade (France), from mature oysters (5 females and 3 males) collected at the oyster parks in Marennes-Oleron bay. Several genitors were used to take account oyster genetic variability at population level and consequently to minimize individual variability [24,25]. One hour after fertilization, embryos were placed into 150 L tanks at a density of 100 embryos/L. All steps of fertilization and rearing were performed in 0.2  $\mu$ m-filtered seawater at 23 °C and aerated under air bubbling. Three independent spawns were performed.

The following stages were identified microscopically and collected: oocytes before fertilization, 2–4 cell stage embryos, morula, blastula, gastrula, trochophore larvae, D-hinged larvae, veliger larvae, larvae aged of 7 and 22 days post-fertilization, metamorphosing larvae and spat (Fig. 1). For total RNA extraction, one million individuals were pooled from oocytes to D-hinged larvae stages; whereas for the later developmental stages only 250,000 individuals were collected. For the spat, total RNA from three organisms was extracted in individuals.

### 2.2. Experimental bacterial challenge

Three non-pathogenic bacterial strains (*Vibrio tasmaniensis*, *V. anguillarum* and *Micrococcus luteus*) were grown separately overnight at 20–25 °C in saline peptone water (peptone 15 g/L; NaCl 15 g/L) for *Vibrio* strains, or at 30 °C in Luria-Bertani medium for *M. luteus*. Experimental bacterial challenges were carried out by immersing the 200,000 embryos or larvae from 3 independent biparental fertilizations, in 2.5 L aquarium filled with filtered seawater at 20 °C under air bubbling. The experimental exposure was performed with a

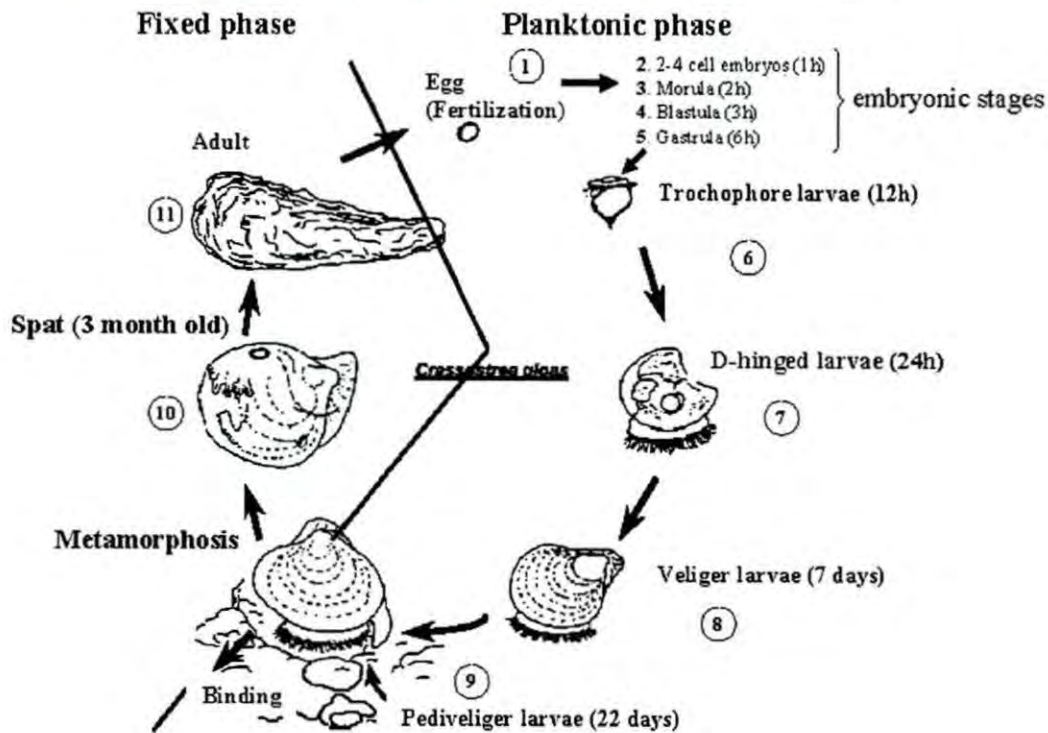


Fig. 1. The life cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. 1: Fertilized oocytes, 2: 2-4 cell embryos, 3: Morula, 4: Blastula, 5: Gastrula, 6: Trochophore larva, 7: D-hinged larvae, 8: Veliger larvae, 9: Pediveliger larvae, 10: Spat and 11: Adult. Stage duration can be highly variable, depending on temperature, food supply, and other factors.

mixture containing the three strains at  $3 \times 10^7$  live bacteria/L. Non exposed embryos and larvae were used as the unchallenged controls. Samples were collected 10 and 24 h post-challenge for RNA extraction. For spats of 3-month old, 50 individuals per experimental condition were used. Experimental exposure was carried out by immersing early juvenile oysters in 20 L seawater tanks with the bacterial mixture described above ( $3 \times 10^7$  and  $5 \times 10^8$  bacteria/L). In parallel, some spats were not exposed and used as controls. Samples were collected 24 h after bacterial challenge then processed for RNA extraction.

### 2.3. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted using TRIzol<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After total RNA treatment with DNase I (2 units, Invitrogen), a second TRIzol extraction was achieved to inactivate DNase. The total RNA concentrations were determined by OD<sub>260</sub> measurements and the RNA integrity was checked by electrophoresis. Two micrograms of total RNA extracted from each developmental stage were reverse transcribed using 200 units of M-MLV

reverse transcriptase (Invitrogen) according to the supplier's instructions.

### 2.4. In situ hybridization (ISH)

All samples were fixed in a solution containing 35% formaldehyde, 40% ethanol and 2% ammonium hydroxide. After dehydration, animals were embedded in Paraplast and seriate 7  $\mu$ m sections were cut, mounted on poly-L-lysine coated slides, and stored at 4 °C until use, digoxigenin (DIG)-UTP-labelled and [<sup>35</sup>S]UTP-labelled anti-sense and sense riboprobes were generated from linearized DNA plasmids by *in vitro* transcription using RNA labelling kits, T3 and T7 RNA polymerase (Roche) and [<sup>35</sup>S]UTP (Amersham). DIG-labelled riboprobes (40–100 ng/slide) and <sup>35</sup>S-labelled riboprobes (10<sup>6</sup> c.p.m./slide) were hybridized on tissue sections according to the previously developed protocol [26].

### 2.5. Conventional polymerase chain reaction (PCR)

Primer sequences, designed with primer 3 software ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) were selected to amplify products in the size range of 125–391 bp. Primer sequences

Table 1

Specific primers and annealing conditions of studied immune-related genes used to do conventional PCR

Gene name	GenBank	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Annealing (°C)
<i>Cg-EF-1α</i>	AB122066	Published [27]		200	50
<i>Cg-def</i>	AJ565499	Published [18]		297	60
<i>Cg-defh2</i>	DO400102	Published [19]		125	55
<i>ficolin3</i>	BQ426875	GGTATGACAATCTGTGCTGA	TGTAATCCGTCCAGTTACG	193	51
<i>α2-macroglobulin</i>	BQ426790	TGTGGGACAAAAGGAAGAGTTG	ACAAACAGGGCAGGACTTGA	159	58
<i>MMP</i>	BQ426653	CTACAAAGACAGGGAGGAAG	GTCAGGGCAAACACACTC	166	55
<i>Drac3</i>	BQ427023	GATAATAGTGCACGGAGTG	CATCAGCATAACAGGTCTTCC	184	55
<i>Cg-tal</i>	AY039650	Published [14]		234	60
<i>Cg-timp</i>	AF321279	Published [15,27]		523	58
<i>galectin8</i>	BQ427054	TGGAAGTTGAATCTGGTCTGG	TGCTGTTAAGAACCATCTCACG	171	58
<i>Cg-LBP/BPI</i>	AY165040	TGTCCTTGCGACGGTCAGTTGTG	GTCCCTCAAATTACCTATATCAGTAAC	199	55
<i>Cg-MyD88</i>	DQ530619	AGGTACCGGCTGTGATACGA	TTCAAACGCCACCAAGACTG	219	53
<i>Cg-ECSIT</i>	BQ427193	CCTCATCGGAATCACACCATTA	CGTGCGAGGGCATATAGAGITTG	227	65
<i>Cg-TRAF3</i>	BQ426746	CAGCCAGCCATTTACACCAGTC	CCGTTTAAAAGTCTGCTTGTGG	247	65
<i>Cg-rel</i>	AY039648	Published [9]		409	65
<i>Cg-EcSOD</i>	DQ010420	Published [17]		160	58
<i>Ring3</i>	BQ426600	AGCAGACACAACCACTCCTG	CTTGGGCTTGATGATnTCC	170	58
<i>Lyn</i>	BQ427191	GGAGCCAAGACCATTGAGG	TGTCATTCTGTCCTTCTGC	172	55
<i>vav</i>	BQ427355	AAGAACACAGAGCTACACAGC	ACTGACTGGCATGACTGAAG	199	58

Table 2

Specific primers and annealing conditions used to measure the expression of immune-related genes by real-time PCR

Gene name	GenBank	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Annealing (°C)	PCR efficiency
<i>Cg-EF-1α</i>	AB122066	Published [27]		200	62	1.94
<i>Drac3</i>	BQ427023	GATAATAGTGCACGGAGTG	CATCAGCATAACAGGTCTTCC	184	62	1.90
<i>Cg-tal</i>	AY039650	Published [14]		234	62	1.99
<i>Cg-timp</i>	AF321279	Published [15,27]		200	62	1.90
<i>Cg-LBP/BPI</i>	AY165040	TGTCCTTGCGACGGTCAGTTGTG	GTCCCTCAAATTACCTATATCAGTAAC	199	62	2.00
<i>Cg-MyD88</i>	DQ530619	AGGTACCGGCTGTGATACGA	TTCAAACGCCACCAAGACTG	219	62	2.00
<i>Cg-EcSOD</i>	DQ010420	Published [17]		160	60	1.99
<i>galectin 8</i>	BQ427054	TGGAAGTTGAATCTGGTCTGG	TGCTGTTAAGAACCATCTCACG	171	62	1.94

are showed in Table 1. PCR were performed using buffer (2 mM MgCl<sub>2</sub>), dNTPs (0.4 mM of each), primers (0.2 μM of each), 1 unit of Taq polymerase (Promega), first strand cDNA sample (0.5 μL), and water. All reactions were performed in 25 μL volume in a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) for 35 cycles. Each sample was amplified twice from each independent spawns. Ten microliters of the amplification products were driven on agarose gel (1.5%). The elongation factor 1α (*Cg-EF-1α*) cDNA [27] was amplified for every sample as a positive control for PCR.

### 2.6. Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR (Q-PCR) analyses were performed using the Lightcycler system version 3.5 (Roche Molecular Biochemicals) with the Lightcycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science). Q-PCR reactions were achieved for 40 cycles in 10 μL volume with final concentration 1X Lightcycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (3 mM MgCl<sub>2</sub>), primers (0.5 μM of each) and first strand cDNA (0.5 μL). The primer sequences, designed with primer 3 software, and conditions are listed in Table 2. Melting curve analysis was performed with continuous fluorescence acquisition (65–95 °C at a temperature transition rate of 0.05 °C/s) to determine the amplification specificity. Amplification efficiencies (*E*) were calculated according to the following equation:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$  [28].

The relative expression level of each gene during the oyster ontogenesis was calculated for 100 copies of the housekeeping gene (*Cg-EF-1α*) by using the following formula:  $N = 100 \times 2^{(Cg-EF-1\alpha - Ct_{\text{target gene}})}$  [29].

For the challenged developmental stages, the relative level of target gene expression was based on a comparative method [28,30]. The relative quantification value of sample, normalized to the *Cg-EF-1α* gene (internal control) and relative to the unchallenged sample, is expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct = Ct$  (target gene) –  $Ct$  (*Cg-EF-1α*) and  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (challenged sample) –  $\Delta Ct$  (unchallenged sample).

### 2.7. Statistical analysis

Data were analyzed using ANOVA and Student's *t*-test and differences were considered statistically

significant at  $p < 0.05$ . All results are represented as mean ± standard error.

### 2.8. Selection of immune-related genes

In order to acquire data on the transcription of immune-related genes during development in *C. gigas*, we have analyzed the expression of 18 genes chosen from a *C. gigas* EST library [12], identified by DD-RT-PCR (differential display reverse transcription PCR) [14,15] or cloned by PCR using degenerated primers [9]. Genes were selected according to their putative function, such as their implication in antimicrobial response, in signaling pathways, in cellular proliferation and in cell cycle (Table 3).

## 3. Results

### 3.1. Expression pattern of 18 immune-related genes during oyster ontogenesis

First, a qualitative screening by PCR was performed in order to examine the expression patterns of each selected gene during development. Then, quantitative screening by Q-PCR was performed for 7 genes. The results for both PCR and Q-PCR analyses from the three independent spawns and three individual spats did not show significant differences meaning that the genetic variability of genitors did not affect the results.

Qualitative PCR was performed with total RNA isolated from 11 development stages (oocytes, 2–4 cell embryos, morula, blastula, gastrula, trochophore larvae, D-hinged larvae, veliger larvae (2 and 7 days), pediveliger larvae (22 days) and spat (Table 3)). The reference gene, *Cg-EF-1α*, was amplified in all stages and in the three independent experiments. Thus *Cg-EF-1α* gene was used as a control.

The PCR results have led to divide the selected genes in 3 clusters (Table 3) according to transcript detection during development. In the first cluster, including the *Cg-def* (mantle), *Cg-defh2* (hemocyte) and *ficolin3* genes, no transcript detection was observed whatever the developmental stage. In the second cluster, including the  $\alpha$ -2 *macroglobulin*, *MMP*, *Drac3*, *Cg-tal*, *Cg-timp* and *galectin 8* genes, the transcripts were always detected in early stages (oocytes and 2–4 cell embryos) and in older stages (trochophore to spat). Detection of transcripts was variable in morula, blastula and gastrula stages. In the third cluster, transcripts were systematically

Table 3  
Expression patterns of selected immune-related genes obtained from embryos and larvae pools by conventional PCR analysis

Genes	Expression site	Functional classification	Oocytes	2–4 cell embryos	Morula	Blastula	Gastrula	Trochophore	D-hinged	Veliger 2 days	Veliger 7 days	Pediveliger 22 days	Spat
hg <i>Cg-EF-1<math>\alpha</math></i>	Ubiquitous	Translation elongation factor [27]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 <i>Cg-def</i>	Mantle	Immunity: Antimicrobial peptide [18]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cg-defh2</i>	Hemocytes	Immunity: Antimicrobial peptide [19]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>ficolin3<sup>a</sup></i>	nd	Immunity: Lectin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2 <i><math>\alpha</math>-2 macroglobulin<sup>a</sup></i>	nd	Immunity: Protease inhibitor	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>MMP<sup>a</sup></i>	nd	Immunity: Protease	+	+	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<i>Drac 3<sup>a</sup></i>	Hemocytes	Cell cycle Barreau-Roumiguère, pers. Comm..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cg-tal</i>	Hemocytes	Immunity: Cellular proliferation [14]	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cg-timp</i>	Hemocytes	Immunity: Protease inhibitor [15,32]	+	+	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<i>galectin 8<sup>a</sup></i>	nd	Immunity: Lectin	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+
3 <i>Cg-LBP/BPI</i>	Hemocytes/epithelia	Immunity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cg-MyD88</i>	nd	Signaling pathways [9]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cg-ECSIT</i>	nd	Signaling pathways [9]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cg-TRAF3</i>	nd	Signaling pathways [9]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cg-rel</i>	Ubiquitous	Signaling pathways [9]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cg-EcSOD</i>	Hemocytes	Immunity [17]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ring 3<sup>a</sup></i>	nd	Cell cycle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lyn<sup>a</sup></i>	nd	Cell cycle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>vav<sup>a</sup></i>	nd	Immunity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

hg, housekeeping gene; nd, not determined; +, detected by PCR; ±, low detected; –, undetected.

<sup>a</sup>Genes from EST library [12].

detected for every gene during all developmental stages. In this group, 4 components belong to signal transduction pathways, i.e. *Cg-MyD88*, *Cg-ECSIT*, *Cg-TRAF3* and *Cg-rel*. The 5 others comprised the *Cg-LBP/BPI*, *Cg-EcSOD*, *Ring3*, *Lyn* and *vav* genes.

Quantitative PCR expression patterns were performed for 7 genes (*Drac3*, *Cg-tal*, *Cg-timp*, *Cg-LBP/BPI*, *Cg-MyD88*, *Cg-EcSOD* and *galectin 8*) during various stages of development. These genes were chosen because they are representative of the clusters 2 and 3 previously described (Fig. 2). Moreover, these genes are involved in adult immune response as protease inhibitor (*Cg-timp*), as recognition receptors by binding to lipopolysaccharide and saccharide ligands on the microbial surface to trigger a host immune response (*Cg-LBP/BPI*, *Cg-EcSOD* and *galectin 8*), as proteins involved in cell proliferation (*Drac3* and *Cg-tal*), and as proteins of signaling pathways (*Cg-MyD88*) (Table 3).

A transcript level decrease of *Drac3*, *Cg-tal*, *Cg-timp* and *galectin 8* (cluster 2), *Cg-LBP/BPI*, *Cg-MyD88* and *Cg-EcSOD* (cluster 3) were observed in morula, blastula and gastrula stages (Fig. 2) compared to previous stages (oocyte, 2–4 cell embryo). *Drac3* and *Cg-tal* transcript abundance significantly increased ( $p < 0.05$ ) in the trochophore larvae compared to gastrula stage expression levels. From the D-hinged larvae to the spat, while the *Drac3* transcript level decreased significantly ( $p < 0.05$ ) but not uniformly, the *Cg-tal* transcript level increased progressively and significantly ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2). *Cg-timp* transcript level (Fig. 2) increased 25-fold in the pediveliger larvae ( $p < 0.05$ ) comparatively to D-hinged larvae. This increase was followed by a significant decrease of the level in spat ( $p < 0.05$ ). Concerning *Cg-LBP/BPI*, the number of transcripts increased significantly from trochophore larvae to spat ( $p < 0.05$ ). For *Cg-MyD88*, transcript level increased significantly ( $p < 0.05$ ) from D-hinged larvae to pediveliger larvae. The highest level of expression was observed in the metamorphosing larvae. Finally, both for *Cg-EcSOD* and *galectin 8* effectors, transcript numbers strongly increased in metamorphosing larvae and spat. In this older stage increases of 177- and 50-fold were seen for *Cg-EcSOD* and *galectin 8*, respectively.

### 3.2. Localization of *Cg-timp*, *Cg-EcSOD*, *Cg-tal*, and *Drac3* expression

In order to identify the potential site of hematopoiesis and to better understand the immune

response, transcripts of 4 genes (*Cg-timp*, *Cg-EcSOD*, *Cg-tal*, and *Drac3*) were detected using *in situ* hybridization (ISH) in 4 larval stages (D-hinged larvae, veliger larvae (2 and 7 days), pediveliger larvae) and in spat.

No labelling was obtained whatever the larval stages and the labelling methods (DIG-UTP or [<sup>35</sup>S] UTP) for the 4 tested genes, while unlabelled hemocytes were always observed. In spat, a strong hybridization signal was observed for *Cg-EcSOD* and *Cg-tal* only (Fig. 3). *Cg-EcSOD* hybridization signal was localized in hemocytes attached to blood vessel endothelium, in circulating hemocytes and in infiltrating hemocytes in gills, mantle and digestive gland. *Cg-tal* hybridization labelling was observed only in hemocytes attached to blood vessel endothelium.

### 3.3. Relative quantification of immune-related gene expression after a bacterial challenge during development

The impact of bacteria challenge was studied by evaluating the differential expression of the 7 genes studied above, i.e. *Cg-tal*, *Cg-LBP/BPI*, *Cg-timp*, *Drac3*, *Cg-MyD88*, *Cg-EcSOD* and *galectin 8*. The transcript levels of these genes were quantified by Q-PCR in 4 development stages (gastrula, D-hinged larvae, veliger larvae, pediveliger larvae). No expression difference was observed for *Cg-EF-1 $\alpha$*  between unchallenged and challenged animals (data not shown) for all developmental stages. Hence, *Cg-EF-1 $\alpha$*  was used to normalize the transcript levels.

The low levels of expression exhibited by *Cg-EcSOD* and *galectin 8* genes during development (Fig. 2) was unaffected by the bacterial challenge (data not shown). It appeared that the transcript number of *Cg-tal* increase in D-hinged and veliger larvae, however these differences were not statistically significant (Fig. 4).

*Cg-LBP/BPI* transcript abundance increase significantly (3-fold,  $p < 0.05$ ) in veliger larvae 24 h post-stimulation comparatively to unchallenged animals. These results reveal that *Cg-LBP/BPI* expression is modulated by the bacterial challenge according to developmental stages (Fig. 4).

*Cg-timp* relative expression in the D-hinged larvae 24 h post-stimulation (Fig. 4) was more than 8-fold higher than in the control ( $p < 0.05$ ). In veliger larvae, a significant increase of the *Cg-timp* transcript level (4-fold,  $p < 0.05$ ) was observed 10 h

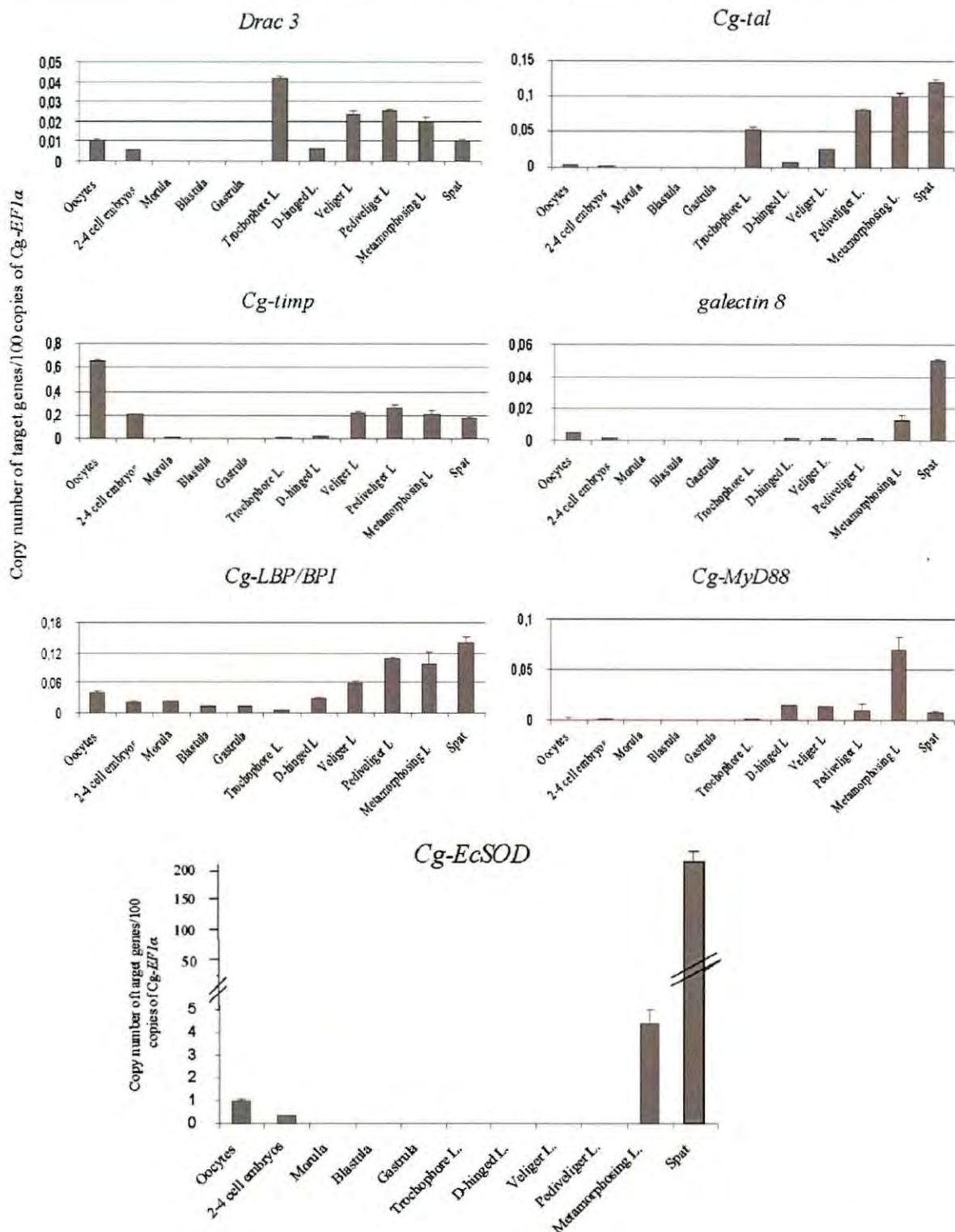


Fig. 2. Expression level of immune-related genes during ontogenesis in *Crassostrea gigas* by quantitative real-time PCR. Each value is the mean  $\pm$  standard error of embryo or larvae pools from three spawns and individual spats. L: larvae.

post-stimulation. *Cg-timp* expression was affected by the bacterial challenge.

A significant increase of the relative expression of *Drac3* ( $p < 0.05$ , Fig. 4) was observed both in

D-hinged larvae and in veliger larvae (3- and 3.4-fold, respectively) 10h post-stimulation. In pediveliger larvae, a significant increase of the relative expression (2.4-fold,  $p < 0.05$ ) was obtained 24h



post-stimulation. *Drac3* was the only gene to be significantly inducible in pediveliger larvae among all the genes that were tested. These results showed a *Drac3* transcript level increase 10 h post-stimulation in early larval stages, whereas in pediveliger larvae, just before the metamorphosis, the induction took more time since the transcript level increased after 24 h.

*Cg-MyD88* relative expression in D-hinged larvae was more than 6- and 33-fold higher 10 and 24 h post-stimulation, respectively, compared to unchallenged animals ( $p < 0.05$ , Fig. 4). In veliger larvae, the transcript level was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in challenged animals compared to unchallenged ones (15-fold). The *Cg-MyD88* transcript abundance was strongly increased in D-hinged and veliger larvae following bacterial stimulation.

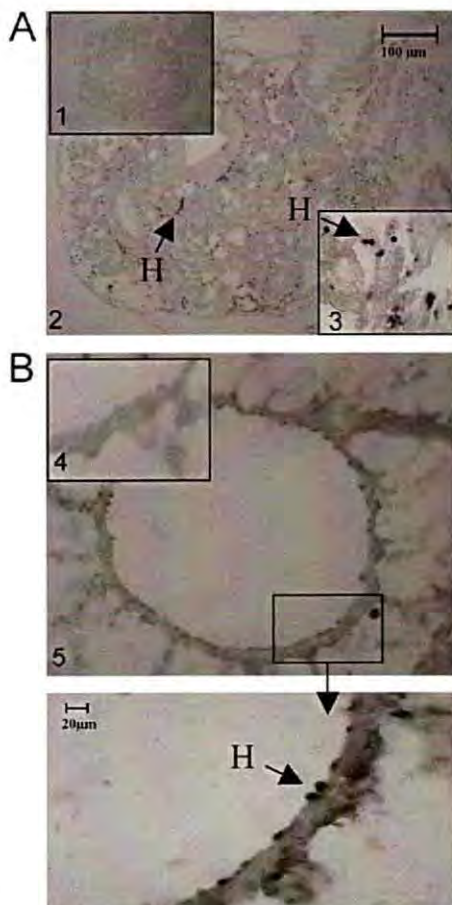


Fig. 3. Detection of *Cg-EcSOD* and *Cg-tal* mRNAs in spat of *Crassostrea gigas* by *in situ* hybridization: (A) *Cg-EcSOD* *in situ* hybridization using anti-sense showed positive signals in infiltrating hemocytes (arrows) in digestive gland (2), gill (3). (B) *Cg-tal*, *in situ* hybridization labelled cells were attached to blood vessel endothelium (5), the shape and the localization of the positive cells evoke hemocytes (arrows). Control consisted of sections hybridized with sense probe, no labelling was observed (1 and 4).

### 3.4. Relative quantification of gene expression in spat after a bacterial challenge

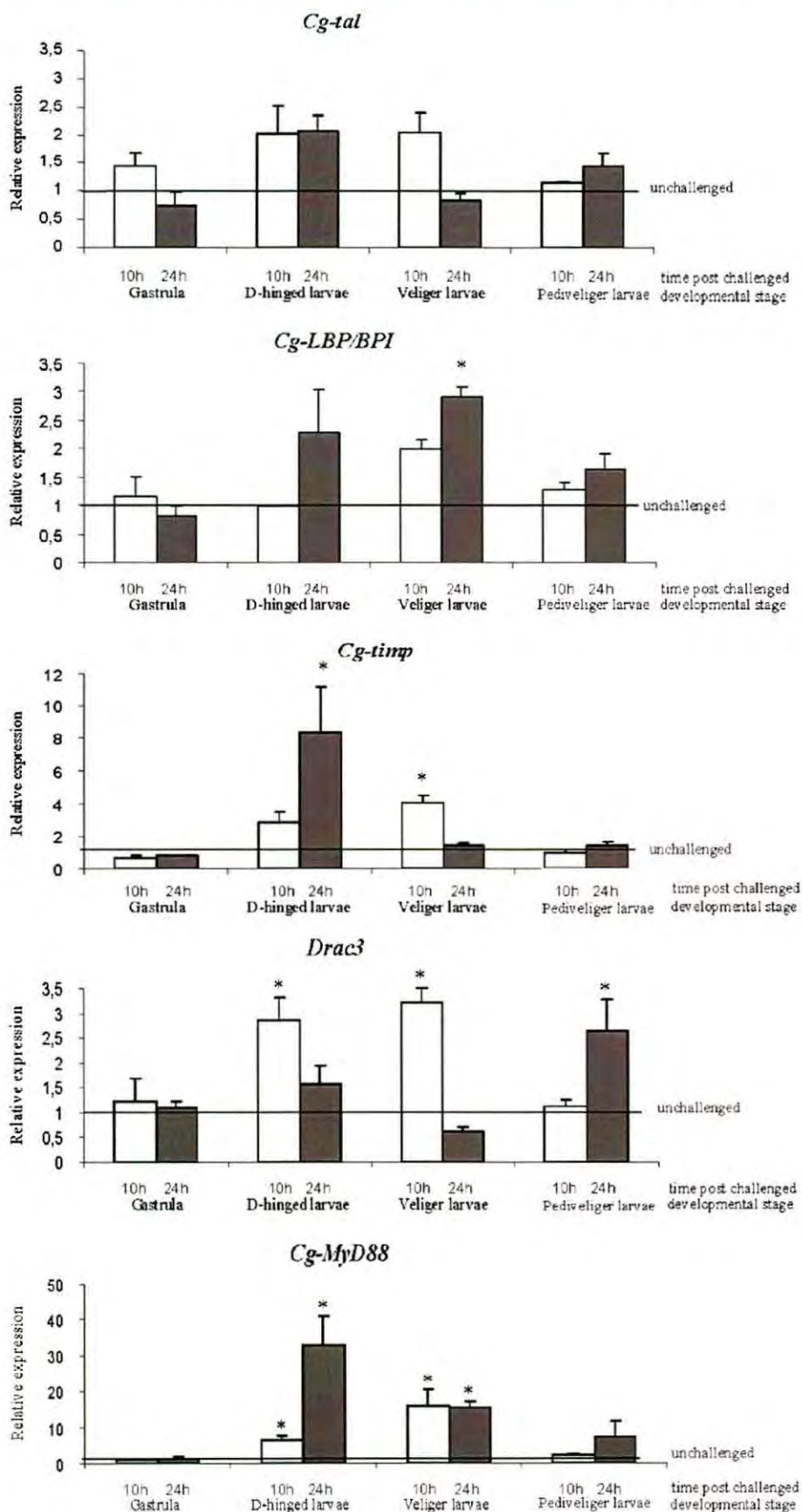
To investigate the possible inductibility and involvement in immune response of *Drac3*, *Cg-EcSOD*, *galectin 8*, *Cg-timp*, *Cg-tal*, *Cg-LBP/BPI* and *Cg-MyD88* in spat, relative expression of these genes were monitored using Q-PCR in whole challenged and unchallenged individuals. The transcript abundance was measured 24 h after exposure (Fig. 5).

*Drac3*, *Cg-EcSOD* and *galectin 8* gene expressions were not affected by bacterial stimulations. *Cg-timp*, *Cg-tal* and *Cg-LBP/BPI* transcript levels were significantly higher (2.1-, 2-, 2.1-fold, respectively,  $p < 0.05$ ) in challenged spats vs. unchallenged spats following exposure to  $5 \times 10^8$  bacteria/L. *Cg-MyD88* relative expression, in challenged animals, was more than 1.7- and 4-fold higher with  $3 \times 10^7$  and  $5 \times 10^8$  bacteria/L, respectively, than in unchallenged animals ( $p < 0.05$ ). However, relative expression was significantly lower when animals were exposed to  $3 \times 10^7$  bacteria/L than relative expression measured in animals exposed to  $5 \times 10^8$  bacteria/L (2.5-fold). These results reveal that in spat, expression of some genes was affected by the bacterial challenge and that the magnitude was dependent on the concentration of the bacteria.

## 4. Discussion

In oysters, differences in the susceptibility to pathogens are observed between larvae, juveniles and adults. While some studies of immunity in oyster adults have been performed [1,31], so far, little is known about the immune system ontogenesis [32,33]. In this study, we investigated the expression of 18 genes, potentially involved in immunity during development of the pacific oyster and studied the impact of a bacterial challenge.

Expression pattern analysis led to classify the 18 genes into three clusters (Table 3). Most transcripts were detected in early stages (oocytes and 2–4 cell embryos) but not in later stages as morula, blastula and gastrula stages. Assuming that embryonic transcription in Mollusks only starts at the compacted morula stage [22], these results suggest that the transcripts detected during the first two developmental stages (oocytes and 2–4 cell embryos) are not produced by the embryo itself but are of maternal origin. RNAs of maternal origin are probably degraded in the older stages explaining



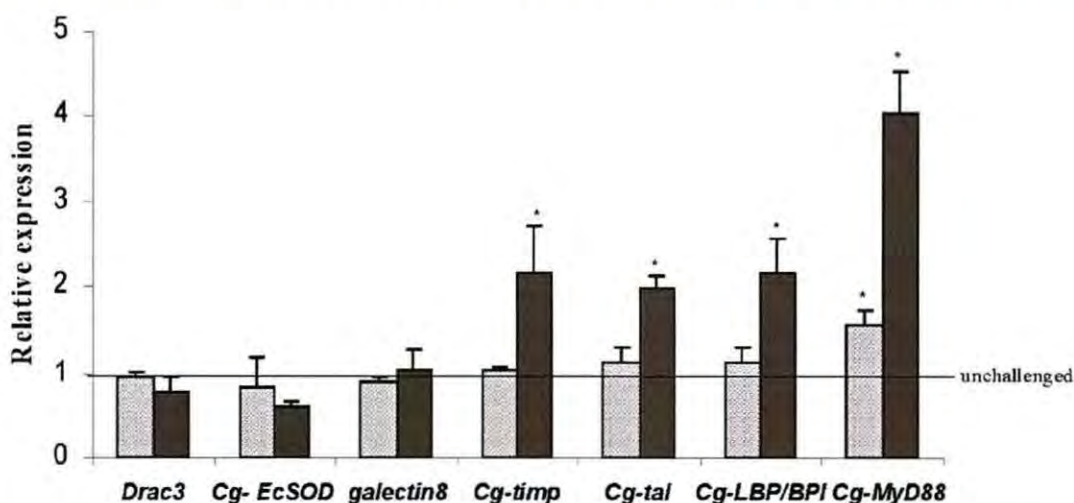


Fig. 5. Relative expression in *Crassostrea gigas* spat of *Drac3*, *Cg-EcSOD*, *galectin 8*, *Cg-timp*, *Cg-tal*, *Cg-LBP/BPI* and *Cg-MyD88*, following a bacterial challenge by quantitative real-time PCR according to Livack and Schmittgen method (2001). Each value is the mean  $\pm$  standard error of three individual spats at 24 h post-stimulation. ■:  $3 \times 10^7$  bacteria/L, ■:  $5 \times 10^8$  bacteria/L, \*Significant difference with unchallenged samples ( $p < 0.05$ ). —: Relative expression of the unchallenged samples. These results were confirmed with two more independent experiments.

the decreases observed in morula, blastula and gastrula stages. The early development of animals is programmed by maternally synthesized RNAs and proteins that are loaded into the developing oocyte by the mother [34]. Because the subsequent phases of embryogenesis require products encoded by zygotically synthesized transcript, these maternal RNAs are rapidly degraded but their stability is regulated in space as well as in time. The complete degradation of these transcripts is achieved differently according to the species [35,36]. Since, most likely the mechanisms that regulate transcript stability are evolutionarily conserved in all metazoa [36], it is assumed that maternal RNA might be regulated in a similar way in oysters.

Hemocytes, which are the immunocompetent cells of the oyster *C. gigas*, participate in a variety of functions [5]. To investigate the putative site of hemocyte generation during development, we quantified the expression and localized the expression sites of *Cg-timp*, *Cg-EcSOD*, *Cg-tal* and *Drac3*. These genes were selected because in the adult oyster they are specifically expressed in hemocytes and are, therefore, considered as hemocyte markers [9,14,15,17]. During oyster development, *Cg-timp*,

*Drac3* and *Cg-tal* transcription levels increase from the trochophore stage. These results suggest that hemocytes are generated at the gastrula-trochophore stages, relatively early after fertilization (10–12 h). At the cellular level, it has been shown that hemocytes are phagocytic cells attached to the surface of visceral cavity in veliger larvae [20]. Increases of *Drac3* and *Cg-tal* expression levels were observed in trochophore stage (Fig. 2). These results suggest that hematopoiesis has been activated and could lead to an increase of hemocyte precursor cell number because *Drac3* and *Cg-tal* are specifically markers of the hemocyte precursor cells. Sasamura et al. [37] showed in *Drosophila* that *Drac3* is essential for hemocyte differentiation, and Barreau-Roumiguere et al. [14] demonstrated that *Cg-tal* belongs to the Tal1/SCL family, which is crucial for the generation of hematopoietic cells in early embryos [38–40]. Moreover, Tal1 is one of the earliest markers of mammalian hematopoietic development i.e. its expression precedes the formation of the hematopoietic sites in mouse [41].

During development, only *Cg-EcSOD* and *Cg-tal* expression sites were clearly observed in serial sections from spat, suggesting that the ISH method

Fig. 4. Relative expression of *Cg-tal*, *Cg-LBP/BPI*, *Cg-timp*, *Drac3* and *Cg-MyD88* in gastrula (6 h post-fertilization), D-hinged larvae (24 h), veliger larvae (2 days) and pediveliger larvae (22 days) of *Crassostrea gigas* by quantitative real-time PCR according to Livack and Schmittgen method (2001), after a bacterial challenge ( $3 \times 10^7$  bacteria/L). Each value is the mean  $\pm$  standard error of embryo or larvae pools from 3 independent biparental fertilizations. □ 10 h and ■ 24 h post-stimulation. \*Significant difference with not challenged animals ( $p < 0.05$ ). —: Relative expression of the unchallenged animals.

is not sufficiently sensitive. Detection with ISH is however dependent on the transcript number per cell. This could explain the lack of detection of transcripts for some genes in early developmental stages. A strong *Cg-EcSOD* positive ISH signal was observed in circulating and infiltrating hemocytes throughout the animal. A *Cg-tal* signal was localized only in hemocytes attached to blood vessel endothelium. No labelled cell was detected in connective tissue. By analogy with the Tal1/SCL role in hematopoiesis in other organisms, these results suggest that hematopoietic cells could not arise from differentiation of connective tissue cells as suggested previously [5] but could rather derive from the vessel or/and artery endothelia cells. Recently, it was demonstrated in mouse, human and chicken embryos that aortic endothelia cells can also give rise to hematopoietic cells [42–44].

The quantification of *Cg-tal*, *Drac3*, *Cg-LBP/BPI*, *Cg-timp* and *Cg-MyD88* transcripts following a bacterial challenge showed that transcription of these genes was activated according to (i) the developmental stage, (ii) the time period between stimulation beginning and quantification, and (iii) the amount of bacteria used for challenge. This suggests that these genes are involved in protection against bacteria during development. In this study, the increase in *Cg-tal* transcription observed after bacterial stimulation in D-hinged, veliger larvae and spat could mean that haematopoiesis was activated and contributed to increase the number of hemocytes. This increase in *Cg-tal* expression was concomitant to that of *Drac3*. Since *Drac3* is essential for hemocyte differentiation in *Drosophila* [37], these results suggest that bacterial stimulation could activate hemocyte differentiation following proliferation. Moreover, since hemocytes are oyster immunocompetent cells capable of non-self recognition and where antimicrobial effectors are produced [1,5], their proliferation could contribute to reinforce the immune response against bacteria in oyster. The hemocyte proliferation should be involved in immune response in *Drosophila* [45,46] and crustacean [47,48].

*Cg-LBP/BPI* are thought to play a significant role in transducing cellular signal from LPS and thus involved in the immune response [49,50]. During oyster development, *Cg-LBP/BPI* transcripts were detected in all stages and a progressive increase in *Cg-LBP/BPI* transcription was observed from D-hinged larvae to spat. In the larvae, the visceral mass has two prominent components: the

velum and the fluid-filled coelomic cavity containing the visceral organs [51]. Various epithelia, especially in the velum and the mantle, constitute the first barrier against bacterial invasion. The progressive increase in *Cg-LPB/BPI* transcription seems to correspond to the apparition of larvae epithelia. These results suggest that *Cg-LBP/BPI* gene could participate actively in the first line of defense during development and also to an acute immune response following a microbial infection since *Cg-LBP/BPI* transcription was activated in larvae stages after a bacterial challenge. *Cg-LBP/BPI* transcription began 10h post-stimulation and increased at 24h. This may result from a hemocyte proliferation, as also sustained by the *Cg-tal* and *Drac3* expression increases.

*Cg-Timp* is a member of the tissue inhibitor metalloprotease family, which the most widely recognized action is inhibition of matrix metalloproteases (MMPs). These genes regulate the proteaceous extracellular matrix homeostasis and a wide range of physiological processes that include embryonic development, connective tissue remodeling, wound healing, glandular morphogenesis and angiogenesis [52]. In this study, *MMP* and *Cg-timp* transcripts were detected from the gastrula to the 22-day larvae suggesting that a local balance between MMPs and TIMPs could be set up during the oyster development. The strong induction of *Cg-timp* was observed in veliger and pediveliger larvae just before metamorphosis. During metamorphosis, drastic morphological changes affect the specific larval organs [53]. These results reinforced and completed the initial study of Montagnani et al. [32] and suggest that *Cg-timp* plays an important role in tissue remodeling during the oyster metamorphosis. Like in adults [15], *Cg-timp* transcription in D-hinged larvae, veliger larvae and in spat was activated meaning that *Cg-timp* transcription is inducible in larvae and would participate in host defense mechanism. In adult, optimal expression was obtained 9 to 12 h post-challenge whereas in D-hinged larvae, the optimal expression was observed 24h post-challenge. This could result from the trigger of hemocyte proliferation and suggests that D-hinged larvae immune system may not be completely mature.

*Cg-MyD88* is expressed in all development stages (Table 3), but expression level remains relatively low and the increase observed in metamorphosing larvae is moderate. *Cg-MyD88* would be involved in regulation of genes involved in development.

Indeed, in *Xenopus*, XMyD88 protein function is required for axis formation [54] and in *Drosophila*, MyD88 is implicated in the dorsal-ventral pattern of embryo [55]. Interestingly, transcription level increased strongly after bacterial challenge in all larval stages and in spat. The prominent role of MyD88 in host innate immunity and inflammation has been studied in various vertebrates and invertebrates species [56–58]. Our results indicate that *Cg-MyD88* may be a key component of the immune response because of its role in the Rel/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway [9]. Components of this pathway plus other adapter proteins such as ECSIT, TRAF,  $\alpha$ IKK, I $\kappa$ B [8,9], appear to be similar to Toll or TLR/IL-1 signalling effectors in *Drosophila* and mammals respectively [11]. In *Drosophila* and mammals, Toll and TLR/IL-1 pathways regulate the expression of many genes involved in various mechanisms of the immune response [59].

*Cg-EcSOD* is weakly expressed during development except in metamorphosing larvae and in spat, where it is strongly expressed (Fig. 2). This gene which encodes an extracellular superoxide dismutase, was only detected in hemocytes both in adults [17,60] and in spat. Moreover, the transcript level was unaffected by bacterial challenge. These results suggest that *Cg-EcSOD* is constitutively expressed and is part of defenses against reactive oxygen species (ROS) and especially superoxide anion [61,62].

All together, the results showed that studying the appearance of immunocompetent cells through their ability to express immune-related genes is a tool to gain insight the ontogenesis of the oyster immune system. First, we showed that while transcription of immune genes in embryos is initiated during the compacted morula stage, it remained low in gastrula and was unaffected following a bacterial challenge. This may be due to the fact that immune system is rudimentary and immature in early embryonic stages. Second, the major maturation events leading to immunocompetence occurred between D-hinged larvae and veliger larvae. At these stages, hemocyte generation/proliferation and induction of immune related genes are concomitant. However, in pediveliger larvae, only *Drac3* transcription level was increased. This stage, which is the last stage of oyster planktonic life, corresponds to anatomic and physiologic intense changes which could be responsible for the reduced capacity of larvae to respond to bacterial infection. Taken together, these results could explain the variability of susceptibility to infections during development.

## Acknowledgments

The authors are grateful to all staff of the hatchery at IFREMER in La Tremblade for breeding oysters and rearing larvae and P. Favrel and C. Lelong for provision of some samples. We thank E. Bachere, D. Destoumieux-Garzon and J. de Lorgeril, for their comments and suggestions on the manuscript, R. de Wit for the English revision and M. Leroy and J. Fievet for technical assistance. This work was supported by the Ministry for foreign affairs of the French Government and IFREMER.

## References

- [1] Bachere E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 2004;198:149–68.
- [2] Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech* 2002;57(6):469–76.
- [3] Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett* 2000;486(3):185–90.
- [4] Hine PM. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 1999;9(5):367–85.
- [5] Cheng TC. Bivalves. London: Academic Press; 1981.
- [6] Dyrnyda E, Pipe R, Ratcliffe N. Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res* 1997;289(3):527–36.
- [7] Gliniski Z, Jarosz J. Molluscan immune defenses. *Arch Immunol Ther Exp* 1997;45(2–3):149–55.
- [8] Escoubas J-M, Briant L, Montagnani C, Hez S, Devaux C, Roch P. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Lett* 1999;453(3):293–8.
- [9] Montagnani C, Kappler C, Reichhart JM, Escoubas JM. *Cg-Rel*, the first Rel/NF- $\kappa$ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett* 2004;561(1–3):75–82.
- [10] Silverman N, Maniatis T. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Develop* 2001;15(18):2321–42.
- [11] Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 2002;3(2):121–6.
- [12] Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguere C, Girardot A-L, Garnier J, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 2003;303:139–45.
- [13] Lemaitre B, Meister M, Govind S, Georgel P, Steward R, Reichhart JM, et al. Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* 1995;14(3):536–45.

- [14] Barreau-Roumiguier C, Montagnani C, Escoubas J-M. Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 2003;27(9):793–800.
- [15] Montagnani C, Le Roux F, Berthe F, Escoubas J-M. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Lett* 2001;500(1–2):64–70.
- [16] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74(2):111–22.
- [17] Gonzalez M, Romestand B, Fievet J, Huvet A, Lebart M-C, Gueguen Y, et al. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(2):1089–97.
- [18] Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, Garnier J, Fievet J, Escoubas J-M, et al. Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*: recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J Biol Chem* 2006;281(1):313–23.
- [19] Gonzalez M, Gueguen Y, Desserre G, de Lorgeril J, Romestand B, Bachere E. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Develop Comp Immunol* 2007;31(4):332–9.
- [20] Elston RA. Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster, *Crassostrea virginica*. *Proc Natl Shellfish Assoc* 1980;70:65–93.
- [21] Elston RA, Leibovitz L. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can J Fish Aquat Sci* 1980;37:964–78.
- [22] Herpin A, Favrel P, Cunningham C. Gene structure and expression of Cg-ALRI, a type I activin-like receptor from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 2002;301(1–2):21–30.
- [23] Herpin A, Lelong C, Becker T, Rosa FM, Favrel P, Cunningham C. 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 Develop* 2005;122(5):695–705.
- [24] Li G, Hedgecock D. Genetic heterogeneity, detected by PCR SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Can J Fish Aquat Sci* 1998;55:1025–33.
- [25] English LJ, Maguire GB, Ward RD. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. *Aquaculture* 2000;187(3–4):283–98.
- [26] Munoz M, Vandenbulcke F, Saulnier D, Bachere E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur J Biochem* 2002;269(11):2678–89.
- [27] Montagnani C, Avarre JC, de Lorgeril J, Quiquand M, Boulo V, Escoubas JM. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Develop Comp Immunol* 2007;31(1):1–11.
- [28] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 2001;29:2003–7.
- [29] Rodet F, Lelong C, Dubos M-P, Costil K, Favrel P. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Gene Structure and Expression* 2005;1730(3):187–95.
- [30] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- [31] Saavedra C, Bachere E. Bivalve genomics. *Aquaculture* 2006;256(1–4):1–14.
- [32] Montagnani C, Tirape A, Boulo V, Escoubas JM. The two Cg-timp mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis. *Develop Comp Immunol* 2005;29(10):831–9.
- [33] Jenny MJ, Warr GW, Ringwood AH, Baltzegar DA, Chapman RW. Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors. *Gene* 2006;379:156–65.
- [34] Davidson E. Gene activity in early development. Academic, Orlando, FL; 1986.
- [35] Bashirullah A, Halsell S, Cooperstock R, Kloc M, Karaiskakis A, Fisher W, et al. Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 1999;18(9):2610–20.
- [36] Bashirullah A, Cooperstock R, Lipshitz H. Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(13):7025–8.
- [37] Sasamura T, Kobayashi T, Kojima S, Qadota H, Ohya Y, Masai I, et al. Molecular cloning and characterization of *Drosophila* genes encoding small GTPases of the rab and rho families. *Mol Gen Genet* 1997;254(5):486–94.
- [38] Green T. Haematopoiesis. Master regulator unmasked. *Nature* 1996;383(6601):575–7.
- [39] Begley CG, Green AR. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* 1999;93(9):2760–70.
- [40] Liao EC, Paw BH, Gates AC, Pratt SJ, Postlethwait JH, Zon LI. SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev* 1998;12(5):621–6.
- [41] Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia ONCOPROTEIN SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 1996;86(1):47–57.
- [42] de Bruijn MFTR, Ma X, Robin C, Ottersbach K, Sanchez M-J, Dzierzak E. Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the Midgestation Mouse Aorta. *Immunity* 2002;16(5):673–83.
- [43] Oberlin E, Tavian M, Blazsek I, Peault B. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* 2002;129(17):4147–57.
- [44] Jaffredo T, Bollerot K, Sugiyama D, Gautier R, Drevon C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int J Dev Biol* 2005;49(2–3):269–77.
- [45] Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U. Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* 2003;5(5):673–90.

- [46] Meister M. Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* 2004;16(1):10–5.
- [47] Soderhall I, Bangyeekhun E, Mayo S, Soderhall K. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Dev Comp Immunol* 2003;27(8):661–72.
- [48] Soderhall I, Kim Y-A, Jiravanichpaisal P, Lee S-Y, Soderhall K. An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis. *J Immunol* 2005;174(10):6153–60.
- [49] Elsbach P, Weiss J. Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence. *Curr Opin Immunol* 1998;10(1):45–9.
- [50] Inagawa H, Honda T, Kohchi C, Nishizawa T, Yoshiura Y, Nakanishi T, et al. Cloning and characterization of the homolog of mammalian lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal permeability-increasing protein in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Immunol* 2002;168(11):5638–44.
- [51] Elston R. Health management, development and histology of seed oysters. Louisiana, USA: The World Aquaculture Society; 1999.
- [52] Cawston TE. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacol Therapeut* 1996;70(3):163–82.
- [53] Bayne B. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia* 1965;2:1–47.
- [54] Prothmann C, Armstrong NJ, Rupp RAW. The Toll/IL-1 receptor binding protein MyD88 is required for *Xenopus* axis formation. *Mech Dev* 2000;97(1–2):85–92.
- [55] Morisato D, Anderson KV. Signaling pathways that establish the dorsal–ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Ann Rev Genet* 1995;29:371–99.
- [56] Takano T, Kondo H, Hirono I, Saito-Taki T, Endo M, Aoki T. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev Comp Immunol* 2006;30(9):807–16.
- [57] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, et al. A.C. MyD88 is an adaptor protein in the hToML-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998;2(2):253–8.
- [58] Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7(6):837–47.
- [59] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-[kappa]B transcription factors. *Oncogene* 1999;18(49):6853–66.
- [60] Huvet A, Herpin A, Degremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 2004;343(1):211–20.
- [61] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 1995;64:97–112.
- [62] Zelko IN, Folz RJ. Spl and Sp3 transcription factors mediate trichostatin a-induced and basal expression of extracellular superoxide dismutase. *Free Rad Biol Med* 2004;37(8):1256–71.

## Résultats complémentaires

### Analyse de l'expression de gènes potentiellement impliqués dans l'immunité au cours du développement chez *Crassostrea gigas* après stimulation avec du milieu de culture stérile et des bactéries tuées

#### 1. Introduction

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons mis en évidence l'induction de l'expression de certains gènes potentiellement impliqués dans l'immunité à différents stades de développement précoce ainsi que chez le naissain de l'huître après l'exposition à des bactéries vivantes non pathogènes. Cette partie a pour objectif d'analyser l'impact de deux conditions de stress complémentaires (milieu de culture stérile et bactéries tuées) sur l'expression des gènes au cours de l'ontogenèse. Pour répondre à cet objectif, nous avons analysé l'expression relative de transcrits de sept gènes cibles *Drac3*, *Cg-EcSOD*, *galectine*, *Cg-timp*, *Cg-Tal*, *Cg-LBP/BPI* et *Cg-MyD88* par PCR en temps réel sur des individus stimulés comparativement à des animaux contrôle non traités. Pour chaque gène, l'expression relative a été mesurée après 10h et 24h post-traitement aux stades embryonnaires et larvaires, et 24 h post-traitement chez le naissain.

#### 2. Animaux et protocole expérimental

Différents stades de développement ont été produits à l'écloserie de l'IFREMER de La Tremblade à partir d'huîtres matures élevées dans les parcs du bassin de Marennes-Oléron. Trois fécondations biparentales indépendantes ont été réalisées pour obtenir les différents stades de développement (gastrula, larve D, larve véligère et larve pédivéligère). Pour chaque stade, deux bacs ont été préparés, un pour les animaux témoins non traités et un pour les animaux exposés à un mélange de 2 milieux de culture stérile, constitué d'une part de milieu LB, Luria Bertani (Bactotryptone 10g/L, extrait de levure 5g/L et NaCl 10g/L) et 2 parts d'eau de peptone saline (peptone 15g/L et NaCl 15g/L). Ces milieux de culture sont utilisés pour faire croître *Micrococcus luteus* (milieu LB), *Vibrio tasmaniensis* et *Vibrio anguillarum* (milieu EPS). Ces bactéries sont non pathogènes pour les huîtres et utilisées en mélange lors des challenges bactériens. Dans chaque bac (aquarium de 2.5 litres d'eau de mer) 400.000 embryons ou larves sont mis en contact avec 1 ml du mélange de milieux et 10 et 24 h après le début de l'exposition, 200.000 animaux sont prélevés pour extraire les ARN totaux et analyser l'expression des gènes d'intérêt par PCR en temps réel.

Cinquante naissains d'environ 1 cm de diamètre ont été prélevés trois mois après la fécondation pour être mis en contact avec un mélange de milieux de culture stérile comme

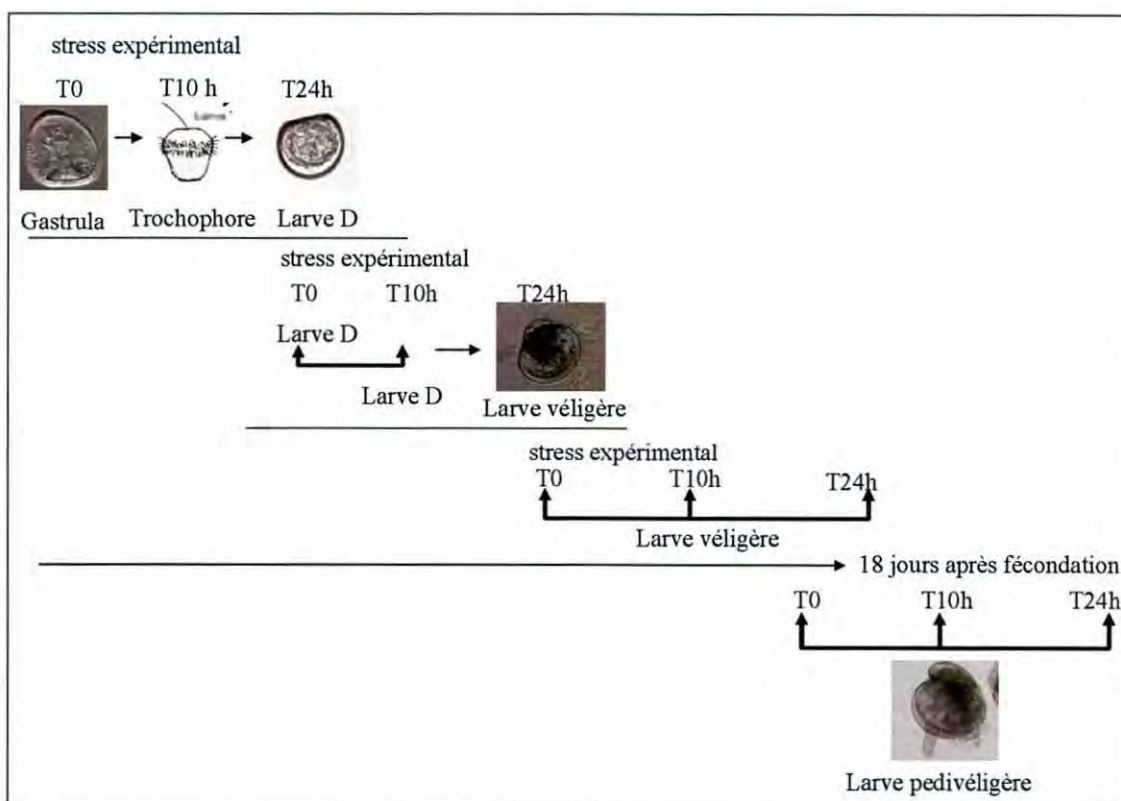


décrit ci-dessus. De plus, une autre condition expérimentale a été réalisée, 50 naissains ont été mis en contact avec  $5.10^8$  bactéries tuées/ml. Des naissains non traités ont été utilisés comme contrôle. Les traitements sont réalisés par baignade dans un volume de 20L d'eau de mer. Vingt quatre heures post exposition les naissains sont prélevés pour extraire les ARN totaux et analyser l'expression des gènes d'intérêt par PCR en temps réel. Des naissains non traités ont été utilisés comme références.

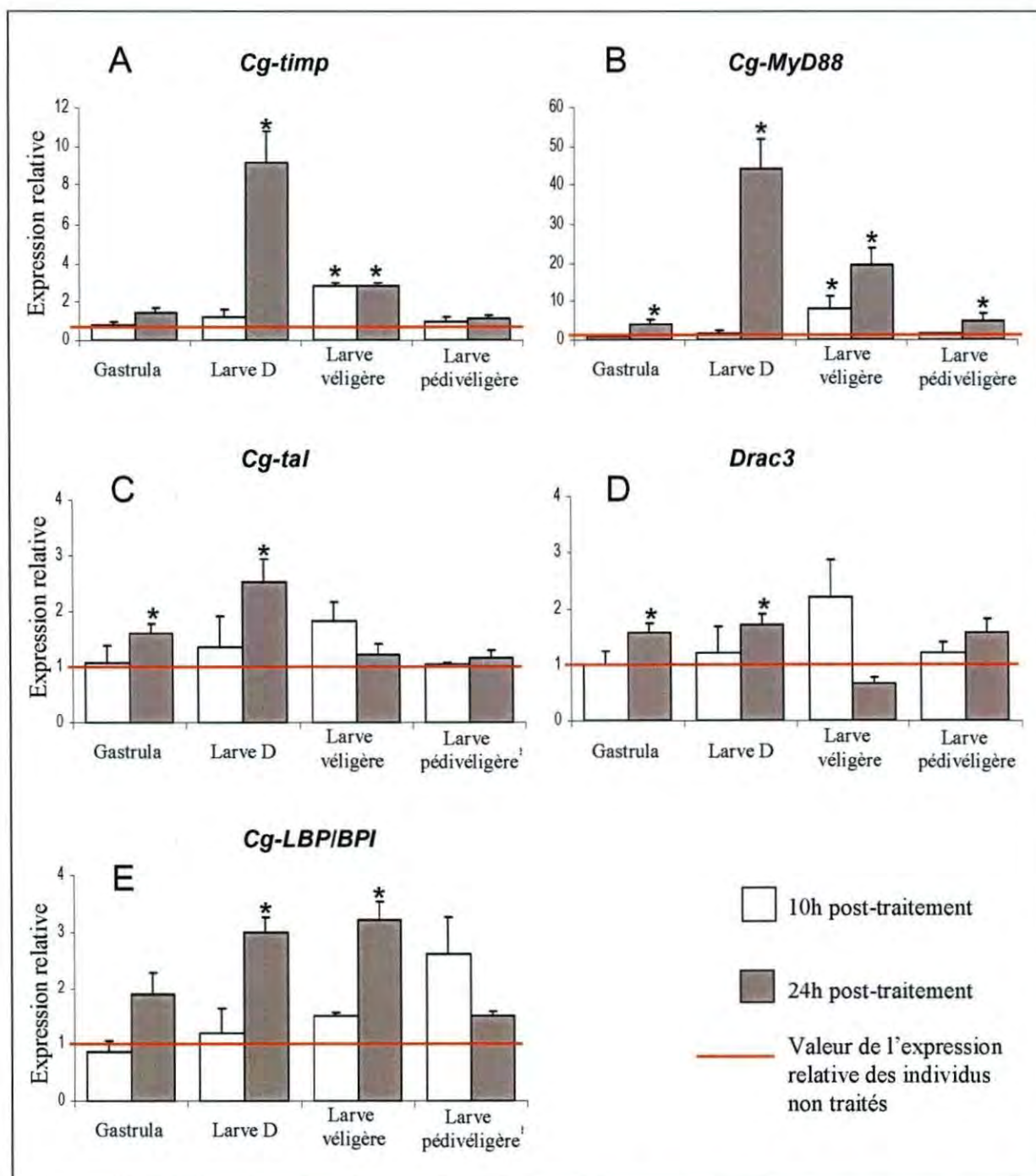
### 3. Résultats

3. 1. Expression relative des gènes après exposition avec du milieu de culture stérile aux stades précoces de développement

L'expression relative des gènes est analysée à quatre stades de développement (gastrula, larve D, larve véligère et larve pédivéligère) et à deux temps post-stimulation (10 heures et 24 heures). Il faut noter que compte tenu du développement relativement rapide des premiers stades embryonnaires chez l'huître après 10h ou 24h d'incubation, il y a un changement de stades (**Figure 22**) qui n'a pas affecté par la stimulation.



**Figure 22:** Evolution des stades de développement pendant l'expérimentation. Les stress expérimentaux sont réalisés aux stades Gastrula, larve D, larve véligère et larve pédivéligère. Les échantillons sont prélevés 10h et 24h post-traitement.



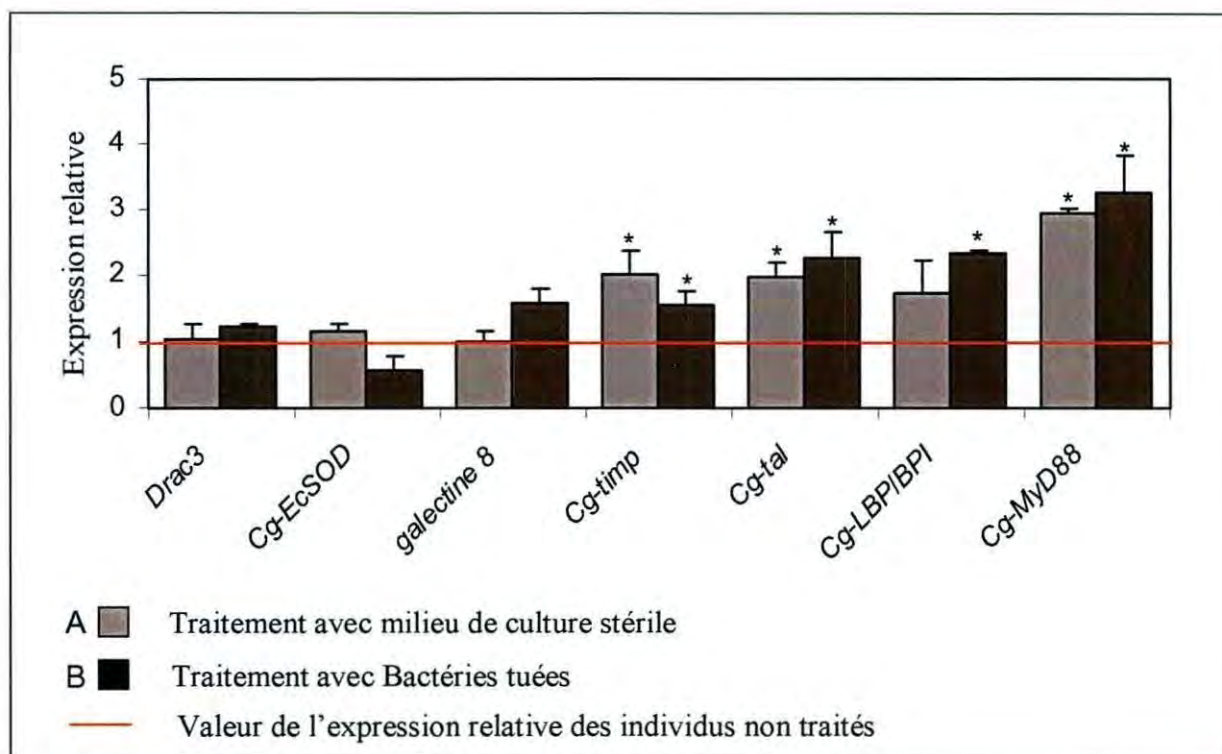
**Figure 23:** Expression relative des gènes (A: *Cg-Timp*, B: *Cg-MyD88*, C: *Cg-Tal*, D: *Drac3*, E: *Cg-LBP/BPI*) potentiellement impliqués dans l'immunité au cours du développement chez *Crassostrea gigas*, en contact avec du milieu de culture stérile LB/EPS (milieu Luria Bertani/eau de peptone saline), à 10 et 24 h post-traitement. Chaque valeur est la moyenne  $\pm$  erreur standard de l'expression relative de pools d'embryons ou pools de larves de 3 familles biparentales indépendantes. \* indique les différences significatives avec les individus non traités

Aucune induction de l'expression des gènes *Cg-EcSOD* et *galectine 8* n'a été observée, quel que soit le stade de développement et la durée de stimulation (10 et 24 h). Une induction de l'expression relative a été observée à 10 h post-traitement seulement pour les gènes *Cg-timp* et *Cg-MyD88* chez les larves véligères (2,8 et 8,0, respectivement) (**Figure 23 A et B**). A 24 h après le traitement, les gènes apparaissent modulés à différents stades. Concernant les gènes *Cg-tal* et *Drac 3* (**Figure 23 C et D**), une augmentation significative de l'expression relative apparaît seulement dans les stades gastrula et larve D d'un facteur de 1,60 et 2,54 respectivement pour *Cg-tal* et de 1,56 et 1,72 respectivement pour *Drac3*, alors que pour les gènes *Cg-timp* et *Cg-LBP/BPI*, une augmentation de la quantité relative des transcrits apparaît significativement plus importante chez les larves D et véligères (9,20 et 2,80 respectivement pour *Cg-timp* et de 2,98 et 3,20 respectivement pour *Cg-LBP/BPI*; **Figure 23 A et E**). Enfin, une augmentation significative de la quantité relative de transcrits de *Cg-MyD88*, a été observée chez les quatre stades de développement, gastrula, larve D, larve véligère et larve pédivéligère (3,93; 44,17; 19,46 et 5,03 respectivement; **Figure 23 B**).

### 3. 2. Expression relative des gènes après un challenge bactérien du naissain

Pour rechercher la possible implication des gènes *Drac3*, *Cg-EcSOD*, *galectine*, *Cg-timp*, *Cg-Tal*, *Cg-LBP/BPI* et *Cg-MyD88* dans la réponse immunitaire chez le naissain, nous avons analysé l'expression de ces gènes par PCR en temps réel sur des individus mis en contact soit avec un milieu de culture LB/EPS stérile soit avec un mélange de bactéries tuées. Pour chaque gène, l'expression relative a été calculée 24 h post-traitement (**Figure 24**). Nous avons pu observer qu'il existe des gènes modulés et non modulés selon leur expression relative et les conditions de stimulation.

Aucune induction de l'expression n'a été observée pour les gènes *Drac3*, *Cg-EcSOD* et *galectine 8*, soit en présence de milieu de culture LB/EPS stérile soit en présence de bactéries tuées. Pour *Cg-LBP/BPI*, une augmentation du nombre de transcrits (par un facteur de 2,33) statistiquement significative ( $p < 0,05$ ), a été observée chez les naissains exposés à des bactéries tuées. L'expression relative des gènes *Cg-timp*, *Cg-tal* et *Cg-MyD88* a été significativement différente ( $p < 0,05$ ) entre les naissains stimulés en présence de milieu de culture LB/EPS stérile et les naissains non traités (augmentation par un facteur 1,99; 1,98 et 2,94, respectivement), ainsi qu'entre les naissains stimulés par la présence de bactéries tuées et les naissains non traités (augmentation par un facteur 1,53; 2,25 et 3,26, respectivement).



**Figure 24:** Expression relative des gènes potentiellement impliqués dans l'immunité chez le naissain de *Crassostrea gigas*. A. après une stimulation avec du milieu de culture stérile LB/EPS (milieu Luria Bertani/eau de peptone saline), B. après une stimulation avec des bactéries tuées, à 24 h post-traitement. Chaque valeur est la moyenne de l'expression relative  $\pm$  erreur standard de trois lots de naissains (3 animaux traités individuellement par lot).

#### 4. Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude complémentaire mettent en évidence que l'expression des gènes potentiellement impliqués dans l'immunité chez *C. gigas* varie en fonction du stade de développement et des conditions de stimulation. Les embryons, les larves et le naissain acquièrent une capacité à répondre à des stress, plus particulièrement à partir du stade trochophore/larve D, stade à partir desquels apparaissent les hémocytes, cellules de l'immunité chez l'huître (Tirapé et al., 2007). Ces résultats complémentaires, avec ceux présentés dans la publication 2 montrent que l'expression de seulement certains gènes est induite.

Les gènes *Cg-EcSOD* et *galectine 8* n'ont pas montré de modulation d'expression quel que soit le stade de développement et les conditions de traitement testées. La SOD fait partie des enzymes anti-oxydantes qui protègent les cellules contre les ROS toxiques produits à l'issu d'une forte réaction oxydative dans l'étape de la dégradation intracellulaire de pathogènes pendant la phagocytose (Fridovich, 1995; Lambert et al., 2003). Par analogie avec ce qui existe chez les organismes supérieurs, il est possible de considérer qu'une surexpression de SOD deviendrait dramatique pour l'hôte en provoquant des dommages

tissulaires. Des études ont montré qu'une surexpression de la SOD peut être létale aux cellules de mammifères. En effet, il apparaît que la SOD agit en tant que protecteur des tissus jusqu'à un certain point, au-delà duquel la protection est perdue et les blessures sont exacerbées, conduisant à une peroxydation lipidique (McCord et Edeas, 2005). La galectine 8 fait partie de la famille des galectines qui jouent un rôle dans la régulation de l'inflammation, la réponse immunitaire, l'adhésion cellulaire, la progression des cancers et des processus de développement (Leffler et al., 2002). Gueguen et al., (2003) ont démontré que dans les hémocytes d'huître adulte, l'expression du gène de la galectine 8 est induit après un challenge avec des vibrios pathogènes. Il faut préciser qu'au cours du développement ce gène a une faible expression. Ces résultats suggèrent qu'au cours du développement *Cg-EcSOD* et *galectine 8* pourraient être impliqués dans l'immunité comme une première ligne de défense, en fonction des analogies que ces effecteurs présentent avec d'autres espèces. En effet, ils peuvent (1) être régulés en réponse à d'autres bactéries (bactéries pathogènes) ou microorganismes, (2) être régulés à un autre niveau que celui de la transcription (régulation post transcriptionnelle) ou (3) être des gènes immunitaires non inductibles (Mitta et al., 2005). De plus, il faut noter que le milieu de culture LB/EPS stérile sans bactérie est capable d'induire une modulation de l'expression de certains gènes (*Cg-timp*, *Cg-MyD88*, *Cg-tal*, *Drac3* et *Cg-LBP/BPI*). La modulation de l'expression de ces gènes pourrait être expliquée par la présence d'extrait de levure (extrait de levure 5g/L) utilisé pour la préparation du milieu de culture LB. Cet extrait correspond à un extrait soluble de cellules de levure autolysées dans l'eau. L'extrait de levure est un mélange d'acides aminés, peptides, vitamines, carbohydrates. Cependant, plusieurs polymères dont le glycogène de la paroi des cellules peuvent rester insolubles (Singleton et Sainsbury, 1991). Selon différentes données de la littérature et les résultats observés dans ces travaux, il est possible de proposer deux hypothèses pour expliquer l'effet du milieu de culture (**Figure 25**).

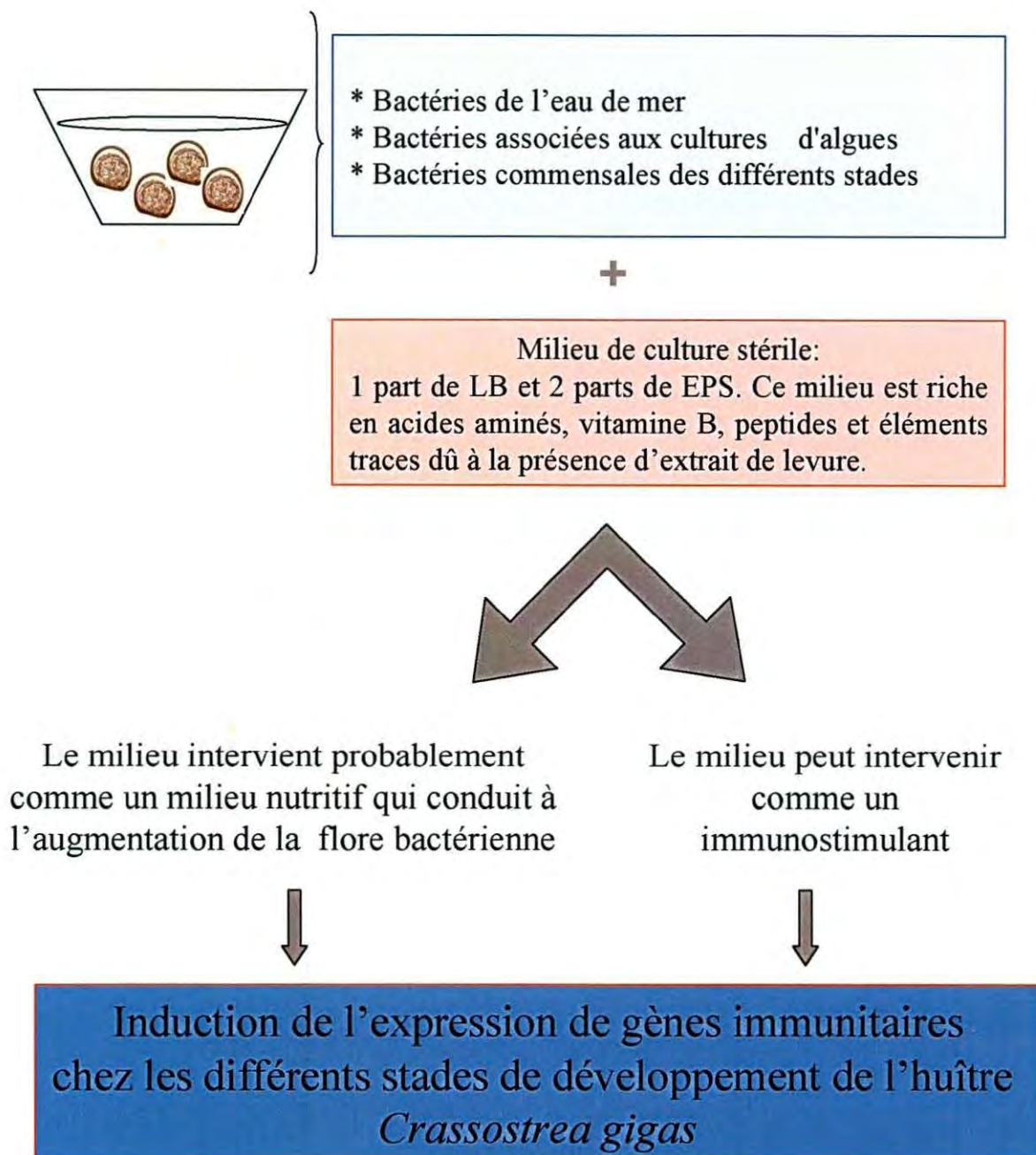
(1) Le milieu intervient comme un élément nutritif pour les bactéries déjà présentes dans l'eau de mer de l'élevage. Dans ce cas, trois sources d'apport de bactéries peuvent être identifiées dans un milieu aquacole confiné tels que les écloseries. La première source est l'eau de mer utilisée pour les élevages, qui contient généralement entre  $10^2$  et  $10^3$  bactéries/ml (Prieur, 1981). Quand l'eau de mer est incubée dans un réservoir avec l'addition de matière organique la diversité des populations bactériennes diminue, mais le pourcentage des bactéries cultivables augmente significativement (Lebaron et al., 2001). La deuxième source est constituée des bactéries associées aux cultures d'algues, utilisées pour l'alimentation des animaux, puisqu'à partir de la larve D le système digestif est développé chez l'huître et le

phytoplancton est utilisé comme nourriture. Les réservoirs de culture d'algues contiennent généralement entre  $10^3$  à  $10^5$  bactéries/ml (Prieur, 1981). L'impact de la croissance bactérienne dans les réservoirs d'élevages larvaires peut être substantiel. Les algues destinées à l'alimentation des élevages sont cultivées généralement dans des conditions non axéniques, ce qui signifie que des bactéries sont présentes (Nicolas et al., 2004). Des bactéries du genre *Vibrio* pourraient avoir un effet nocif sur les larves (Lee et Park, 1998; Park et al., 1998; Hold et al., 2001). En effet, différentes espèces de *Vibrio* ont été identifiées comme pathogènes dans les élevages d'huîtres (Sugumar et al., 1998) et certaines bactéries pourraient avoir une influence bénéfique (Fukami et al., 1997; Suminto, 1997). Finalement la troisième source d'apport de bactéries est l'huître elle-même. De part son d'alimentation par filtration, elle accumule un grand nombre de bactéries à partir de l'eau de mer (Canesi et al., 2002). Chez les huîtres adultes une étude a démontré qu'il existe  $10^8$  bactéries/ml dans les fèces,  $10^7$  bactéries/ml dans les sucs gastriques,  $10^5$  bactéries/ml dans le sac du stylet et  $10^4$  bactéries/ml dans les branchies, les fluides du manteau et muscle adducteur. Parmi ces bactéries, 37 % sont des *Pseudomonas* et 14% des *Vibrios* (Kueh et Chan, 1985).

(2) Le milieu intervient comme un immunostimulant en tant qu'élément nutritif dû à la présence d'extrait de levure. La paroi cellulaire des levures est formée par des  $\beta$ -1,3-glucan,  $\beta$ -1,6-glucan, des mannoprotéines et la chitine (Cabib et al., 1982). Chez les vertébrés, chacun de ces composés isolés est connu pour augmenter les mécanismes de défense innée et/ou la résistance aux maladies (Engstad et Robertsen, 1993; Esteban et al., 2000, 2001; Pietrella et al., 2001). Le  $\beta$ -Glucan est connu en tant qu'immunostimulant par l'effet significatif qu'il produit sur les systèmes de défense de l'hôte (Yadomae et Ohno, 1996). Plus récemment, des mannoprotéines se sont également montrées capables de conduire à une production massive d'interleukine-12 par des macrophages, agissant de ce fait en tant que médiateurs inflammatoires (Pitzurra et al., 2000; Pietrella et al., 2001). Concernant la chitine, le composant le moins abondant de la paroi cellulaire des levures, quelques études ont prouvé que la chitine et ses dérivés modulaient le système immunitaire des mammifères aussi bien que des poissons (Suzuki et al., 1984; Esteban et al., 2000, 2001; Cuesta et al., 2003). Son activité immunomodulatrice semble être associée à la reconnaissance par un récepteur de type lectine situé à la surface des macrophages (Shibata et al., 1997; Cuesta et al., 2003). Chez les invertébrés, et plus particulièrement chez la crevette, quelques rapports ont démontré que les extraits de levures et leurs produits dérivés, tels que la paroi cellulaire ont des propriétés immunostimulantes après une administration orale par l'alimentation (Takahashi et al., 2001; Supphantharika et al., 2003). En conclusion, la combinaison de tous les composés cellulaires

des levures, non seulement des sucres de la paroi cellulaire mais également les vitamines et le matériel génétique, pourrait conduire à un optimum physiologique des huîtres dû aux interactions multiples (Kulkarmi et al., 1987; Rodriguez et al., 2003) en particulier en ce qui concerne le système immunitaire.

Dans leur ensemble ces résultats montrent que les huîtres au cours de leur développement acquièrent progressivement un système immunitaire qui leur permet de répondre aux stress, le profil de cette réponse étant variable selon le gène et selon la qualité du traitement appliqué.



**Figure 25.** Hypothèses de l'implication du milieu de culture stérile dans l'expression de gènes immunitaires chez *Crassostrea gigas*.

## **CHAPITRE II**

**Identification de gènes différentiellement exprimés chez l'huître,  
*Crassostrea gigas* au cours de l'ontogenèse.**



## Chapitre II

### **Identification de gènes différentiellement exprimés chez l'huître, *Crassostrea gigas* au cours de l'ontogenèse.**

**Publication 3:** Molecular identification and expression study of genes differentially expressed in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during the ontogenesis.

Pour être soumis dans Gene

Chez l'huître *Crassostrea*, des progrès ont été réalisés au cours des dernières années sur l'identification de gènes impliqués dans les processus physiologiques par le développement d'approches génomiques. La réalisation de banques d'ADN complémentaires (ADNc) suivie par le séquençage en masse d'ESTs et leur identification par recherche d'homologies sur les bases de données, conduit à l'analyse de transcriptomes à haut débit. Chez l'huître, 2 programmes ESTs ont permis l'identification de transcrits de gènes à partir de différents organes provenant de deux espèces d'huîtres, *C. virginica* et *C. gigas* (Jenny et al., 2002 ; Gueguen et al., 2003). De plus, plusieurs banques soustractives d'ADNc représentant différentes conditions physiologiques à partir de différents tissus, comme la glande digestive exposée à des polluants, les hémocytes exposés à des protozoaires pathogènes, la gonade/manteau dans les conditions de mortalités estivales, ont été construites (Huvet *et al.*, 2004; Tanguy *et al.*, 2004 et 2005 ; Boutet et al., 2004; David et al., 2005). Concernant les différents stades de développement de l'huître, un seul programme ESTs a été réalisé à partir du stade larve D pour étudier l'impact de polluants (Jenny et al., 2002 et 2004).

Dans le premier chapitre de cette thèse nous avons analysé l'expression de gènes au cours du développement, qui avait été préalablement identifiés et dont la caractérisation fonctionnelle avait été entreprise au laboratoire pour certains d'entre eux chez l'adulte. Afin d'identifier d'autres gènes et notamment exprimés plus spécifiquement au cours du développement, nous avons réalisé des banques soustractives d'ADNc (SSH : « suppressive subtraction hybridization ») à partir de stades clés du développement déduit sur la base des résultats du premier chapitre. En effet, compte tenu que la transcription semble initiée au stade morula et que les hémocytes apparaissent au stade gastrula-larve trochophore, le stade larve D est apparu comme un stade central à prendre en compte comparativement aux stades plus précoces, morula, blastula et gastrula et au stade plus tardif, le naissain de 2 mois après la

métamorphose. Le naissain a aussi été choisi parce que ce stade est constitué de tous les organes de l'huître adulte avec une complexité similaire (Elston, 1999). Quatre banques soustractives ont été construites, les stades précoces (morula, blastula et gastrula) vs larve D d'une part et d'autre part larve D vs naissain.

Un total de 668 ESTs ont été obtenus et répartis en 6 catégories fonctionnelles sur la base des homologies de séquences avec les bases de données publiques et l'utilisation de « Gene Ontology ». Une fonction putative a été assignée à 26% des ESTs analysés, 10% des ESTs présentent des homologies avec des protéines dont la fonction est inconnue, signifiant que 64% des ESTs correspondent à des protéines nouvelles. L'analyse des séquences a montré que la catégorie regroupant des gènes impliqués dans le métabolisme était la catégorie fonctionnelle prédominante quelque soit la banque analysée.

Indépendamment du classement par catégories fonctionnelles, nous avons sélectionné 13 ESTs qui selon la littérature chez d'autres espèces, pouvaient avoir une implication dans des mécanismes biologiques liés au stress et à la réponse immunitaire innée de l'hôte. Cette sélection incluait des gènes impliqués dans la réponse cellulaire tels que des gènes codant des molécules d'adhésion (galectine, fasciline 1), dans des processus cytotoxiques (catalase, calmoduline); des gènes codant des protéines de stress (hsp27, ferritine), des protéases et des inhibiteurs de protéases (cathepsine B, serpine, inhibiteur de protéase de type Kunitz), des protéines transmembranaires (caveoline 1 et 3), des gènes intervenants dans la cascade de signalisation cellulaire NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) et dans des processus d'apoptose (*myc* homologue). Les profils d'expression de ces gènes ont montré une certaine spécificité d'expression selon les stades, confirmant l'identification de gènes plus spécifiquement exprimés dans certains stades de développement, à travers la réalisation de nos quatre banques soustractives.

**Molecular identification and expression study of genes differentially expressed in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during the ontogenesis**

**Pour être soumis dans Gene**

Ana Tirapé<sup>a</sup>, Julien de Lorgeril<sup>a</sup>, Perrine Lallemand<sup>a</sup>, Pascal Phelipot<sup>b</sup>, Viviane Boulo<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>UMR5119, IFREMER, CNRS, UMII, Ecolag, Université de Montpellier II, 2 Place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier Cedex 5, France

<sup>b</sup>IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade, 17390, France

---

**Abstract**

The work presented here reports the identification of genes differentially expressed at several oyster developmental stages and susceptible to play a role in immunity. We generated four cDNA libraries of transcripts more abundantly expressed at early developmental stages, D-hinged larvae and spat using a suppression subtractive hybridization (SSH) method. A total of 991 expressed sequences tagged (EST) sequenced, led to 668 unique sequences. Putative functions could be assigned to 26% of ESTs analyzed. Metabolism was the predominant functional category (11.7% of ESTs) but more than 70% of messages encoded proteins either completely novel or related to genes of unknown function. Finally, 13 ESTs were selected on the basis of their potential implication in the immune response according to their function in other species. The quantitative expression of these ESTs were analyzed from samples used for SSH construction and during the different development stages from oocytes to spat to evaluate the expression patterns and confirm the differential expression between the development stages. Genes identified here may be potential markers that could be used in future as indicators for susceptibility to pathogens.

*Keywords:* Bivalve Mollusk; larvae; early juveniles; gene expression; immunity; development.

---

\* Corresponding author:

UMR5119, IFREMER, CNRS, UMII, Ecolag, Université de Montpellier II, 2 Place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Phone number: 33 (0)4 67 14 47 06

Fax number: 33 (0)4 67 14 46 22

Email address: [vboulo@ifremer.fr](mailto:vboulo@ifremer.fr)

## **1. Introduction**

Marine animals are subjected to stressful environmental and ecologic conditions that support the development of diseases. Differences in the susceptibility to pathogens are observed between larvae, juveniles and adults. Since 1991, massive mortalities in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the larval and juvenile stages have been reported during summer months in France in natural sites and in hatcheries (Arzul et al., 2001; Le Roux et al., 2002). Studies of these recurring episodes indicate that they are caused by several factors: infectious agents, environmental conditions, and related to the physiology and genetic of the host (Gouilletquer et al., 1998; Samain et al., in press). Looking at this mortality phenomenon, the acquisition of knowledges in physiology appears of prime importance. The knowledge of physiology in oysters at the molecular level was firstly focalized on single-gene studies, i. e., genes involved in the formation of shell (Zhang et al., 2003; Li et al., 2004), in metabolic processes like reproduction (Fabioux et al., 2004), genes related to pollution and stress response (Tanguy et al., 2001; Boutet et al., 2003) and genes related to immunity and disease resistance (Escoubas et al., 1999; Montagnani et al., 2001; Gonzalez et al., 2005; Gueguen et al., 2006). More recently, considerable progresses have been made based on transcriptomic and proteomic approaches which are carried out to study the genetic and molecular bases of traits of interest in bivalves, mainly disease susceptibility and tolerance to environmental stress (Gueguen et al., 2003; Huvet et al., 2004; Tanguy et al., 2004; David et al., 2005). These EST collections and the subsequent printing of microarrays are used like a global approach to identify gene clusters with putative functions in the cellular and biochemical processes (Jenny et al., in press). Whereas these technological advances have permit to increase the knowledges in physiology at the molecular level in adult oyster so far little is known during oyster ontogenesis. To date, few EST projects has been developed in D-hinged larvae of *C. virginica* and allowed the identification of potential indicators of metals homeostasis, detoxification and stress response (Jenny et al., 2002; Jenny et al., 2004). In a previous paper, we reported the expression analysis of immune-related genes during ontogenesis in the oyster *C. gigas* and suggested that the immune system is rudimentary and immature in early embryonic stages and that the hemocytes, oyster immune competent cells, are generated at the gastrula-trochophore stages (Tirapé et al., 2007). These results explain that the major maturation events leading to immunocompetence occurred between D-hinged larvae and veliger larvae. In the present study, we focused on the identification of new genes differentially expressed in early (morula, blastula and gastrula), medium (D-hinged larvae) and last (spat) developmental stages. As a first step, we generated four differential cDNA

libraries from these stages of development in *C. gigas* and identified 13 candidate genes after ESTs sequencing, susceptible to play a role in immunity. Then, we investigated their expression patterns during the different development stages.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Biological material*

Oysters at various developmental stages were produced at the IFREMER hatchery, La Tremblade (France), according to the protocol described in Tirapé et al., (Tirapé et al., 2007). For SSH libraries construction, five developmental stages were used (i) morula, (ii) blastula, (iii) gastrula, (iv) D-hinged larvae stages which were identified microscopically and collected 1, 3, 6 and 24 h post-fertilization, respectively, and (v) spat, collected 3 months post-fertilization. For gene expression analysis, 11 development stages were collected (oocytes, 2-4 cell embryos, morula, blastula, gastrula, trochophore larvae, D-hinged larvae, veliger larvae, pediveliger larvae, metamorphosing larvae and spat) (Fig. 1). Three independent spawns were performed.

### *2.2. RNA isolation*

For subtractive library construction, total RNA was extracted using TRIzol™ Reagent (Invitrogen) from a pool of four millions embryos (morula, blastula, gastrula), from a pool of four millions larvae and from a pool of 20 spats. The total RNA concentrations were determined by OD<sub>260</sub> measurements and the RNA integrity was checked by electrophoresis. Poly (A)<sup>+</sup> RNA was isolated from total RNA using NucleoTrap<sup>R</sup> mRNA purification kit (BD Biosciences, Clontech) according to the manufacturer's instruction. For gene expression analysis the total RNA from 11 development stages were extracted using TRIzol™ Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and as described previously (Tirapé et al., 2007).

### *2.3. cDNA subtractive library construction, cloning, sequencing and sequence analysis*

Four libraries were constructed using SSH method (Fig. 1). In library I a pool of morula, blastula and gastrula was used as tester and D-hinged larvae as driver; in library II, D-hinged larvae was used as tester and pool of morula, blastula and gastrula as driver; in library III, D-hinged larvae was used as tester and spat as driver; and in library IV, spat was used as tester

and D-hinged larvae as driver. First and second strand cDNA synthesis, RsaI endonuclease enzyme digestion, adapter ligation, hybridization, and PCR amplification were performed as described by the PCR-select cDNA subtraction manufacturer (Clontech). The SSH efficacy was evaluated by semi-quantitative PCR (data no shown), using a known oyster gene, *Cg-rel*, which is constitutively and ubiquitously expressed in adult oyster and during the ontogenesis (Montagnani et al., 2004; Tirapé et al., 2007). PCR products were cloned into pCR<sup>R</sup> 4-TOPO cloning vector using TOPO TA cloning kit (Invitrogen) and transformed into TOP10 One Shot<sup>R</sup> *Escherichia coli* cells (Invitrogen). Subtracted cDNA clones randomly selected were single-pass sequenced using a MegaBACE 1000 DNA Analysis system (Amersham Bioscience).

Vector and adaptor sequences were trimmed from all sequences. ESTs, greater than 150 bp in length were assembled in contigs using the CAP3 assembly program (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>). Consensus sequences from contigs or unique sequences from singletons were analyzed using BlastX, BlastN programs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequences were considered homologue when matches presented *E*-values lower than  $10^{-3}$ .

#### 2.4. Real-time quantitative PCR and expression analysis

In first time, total RNA isolated from pool of morula, blastula and gastrula, D-hinged larvae and spat used for SSH libraries construction, served as a template for real-time quantitative PCR amplification using the Lightcycler system version 3.5 (Roche Molecular Biochemicals) with the Lightcycler-FastStart DNA Master SYBR Green 1 (Roche Applied Science) as described in Tirapé et al., (Tirapé et al., 2007). The primer sequences, designed with primer 3 software ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) and the PCR conditions are listed in Table 1. The expression level of selected genes was normalized to housekeeping gene *Cg-EF-1 $\alpha$*  (Montagnani et al., 2007) according to the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001), where  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (sample) -  $\Delta Ct$  (calibrator).  $\Delta Ct$  is the Ct of target gene subtracted from the Ct of *Cg-EF-1 $\alpha$* . For this expression analysis, the earliest stage served as calibrator.

In second time, total RNA isolated from 11 development stages (described above in § 2.1.) was used to analyze the selected gene expression. The relative expression for each gene was calculated for 100 copies of the housekeeping gene (*Cg-EF-1 $\alpha$* ) by using the following formula:  $N = 100 \times 2^{(Ct_{Cg-EF-1\alpha} - Ct_{target\ gene})}$  (Rodet et al., 2005).

Real-time quantitative PCR results are presented as mean  $\pm$  standard error. All data were analyzed using ANOVA and Student's t-test. Significance was established at  $p < 0.05$ .

### 3. Results.

#### 3.1. General characteristics of SSH libraries

In order to identify differentially expressed genes during ontogenesis in the oyster *C. gigas*, four SSH libraries were constructed (Fig. 1). The first two ones were obtained by subtraction between pooled of morula, blastula and gastrula (early development stages) and D-hinged larvae (medium developmental stage). The second two ones were constructed by subtraction between D-hinged larvae and spats (later developmental stage). From the four SSH libraries, a total of 1439 clones were selected and single-pass sequenced, resulting in the characterization of 991 ESTs that were longer than 150 bp (Table 2). The insert average size was estimated to be 770 bp by PCR amplification of inserts of 96 randomly selected clones. The ESTs coalesced into 435 singletons and 233 contigs, corresponding to 668 unique sequences, and suggesting that the overall redundancy average of the library was 23.5%. The search for homology using GenBank database revealed that 172 sequences have a high similarity to genes with a known function ( $E$  value  $< 10^{-3}$ ), 69 sequences corresponded to genes with an unknown function and 427 sequences were new expressed sequence tags.

#### 3.2. Functional categories of isolated genes from SSH libraries

The 172 ESTs were assigned to a function based on their sequences identity with Genbank database and according to "Gene Ontology" classification (<http://www.geneontology.org/>) (Table 2). Thus, the ESTs were associated to six major cellular physiological functions, (i) immunity; (ii) metabolism; (iii) signaling transduction; (iv) replication, repair, transcription and translation; (v) cytoskeleton production and maintenance; and finally (vi) transport. The sequences were classified by functional categories for each SSH library: in library I, 84 down-regulated ESTs in D-hinged larvae vs early developmental stages (Table 3); in library II, 175 up-regulated ESTs in D-hinged larvae vs early developmental stages (Table 4); in library III, 181 up-regulated ESTs in D-hinged larvae vs spat (Table 5) and in library IV, 228 down-regulated ESTs in D-hinged larvae vs spat (Table 6). High percentages of no hit sequences, 64.3, 60.6, 70.7, 61% and moderate percentages of unknown sequences, 11.9, 13.1, 8.8, 8.8% for each SSH library were found. The metabolism category was predominant in the four libraries (Table 2). Inside this category, we have identified two protease inhibitors *serpin* and *kunit-like protease* inhibitor, a *chaperonin1*, a *chitinase*, a *catalase*, a *cathepsin B*, and two heat shock proteins (*hsp27* and *hsp40*). Several ribosomal proteins were also detected in both

forward and reverse libraries. The signaling transduction category, including *calmodulin*, *caveolin 3*, *fasciclin 1*, *pannexin* and *IκB* (Inhibitor of nuclear factor *Kappa B*), was the second most abundant functional category present in both libraries I and III. For libraries II and IV, the second most represented category were cytoskeleton production where *caveolin 1* was identified and replication, repair, transcription, translation category including *myc* homolog, respectively.

Moreover, we isolated a *ferritin* that belongs to the transport category (library IV) and a *PP2A* inhibitor (protein phosphatase 2A inhibitor) that belongs to replication, repair, transcription, and translation category (library I). In all libraries, only 1 gene, corresponding to a lectin, belonging to the immunity category was identified (library II, *galectin 8*).

### 3.3. Relative expression of selected genes differentially expressed in the four SSH

Expression patterns of 19 ESTs, assigned to different functional categories (Tables 3, 4, 5, 6; ESTs in grey), including 7 ESTs from pooled early development stages vs D-hinged larvae libraries (libraries I and II) and 14 ESTs from D-hinged larvae vs spat libraries (libraries III and IV), were analyzed from samples used for library construction using real-time quantitative PCR (Fig. 2 and 3). Two ESTs, *myc* homolog and *Caveolin 1*, were presented in both libraries II-IV and II-III, respectively.

*Pannexin* and *PP2A* inhibitor isolated from the library I showed significantly higher mRNA expression level in pooled early development stages comparatively to the D-hinged larvae (0.3 and 0.5 fold, respectively) (Fig. 2A).

Four genes identified from the library II, *hsp40*, *caveolin 1*, *IκB* and *myc* homolog, exhibited a transcript abundance significantly higher in the D-hinged larvae than in the pooled early development stages with a factor of 2.3, 4.7, 2, 7 fold, respectively (Fig. 2B). No differential expression was observed for *galectin 8* (data not shown).

The pattern of 10 genes identified from the library III, *chaperonin 1*, *chitinase*, *catalase*, *serpin* and *kunitz-like protease* inhibitor; *caveolin 1*; *caveolin 3*, *fasciclin 1* and *calmodulin* and *histone 2A* were analyzed. All these genes exhibited a transcript abundance significantly higher (5 to 11000 folds) in the D-hinged larvae than in the spats (Fig. 3A).

Four genes isolated from the library IV, *hsp27* and *cathepsin B*, *ferritin* and *myc* homolog, showed higher relative expression (18 to 1600 folds) in spat comparatively to D hinged larvae (Fig. 3B).

All these results of gene expression confirmed the genes differentially identified by SSH method.



### 3.4. Expression patterns of selected genes during *C. gigas* ontogenesis

In order to monitor gene expression over the ontogenesis and to confirm the differential expression of genes identified in the SSH libraries, 13 ESTs, among these previously tested (§ 3.3), were selected according to their putative function. The expression patterns of these 13 ESTs were performed from 11 developmental stages (oocytes to spat) using real-time quantitative PCR (Fig. 4 and 5).

Among genes isolated from library I, only *PP2A* inhibitor was analyzed and showed expression in all developmental stages with a significant increase ( $p < 0.05$ ) of expression in metamorphosing larvae. However, we observed a significant fall ( $p < 0.05$ ) of transcript number in spat stage (Fig. 4A).

Two genes were selected from library II. The first one, *Ikb* appeared to be expressed in all developmental stages with a progressive increase from D-hinged larvae to spat ( $p < 0.05$ ). The second gene, the *caveolin 1*, presented a low transcript number from oocytes to trochophore stage, but a significant increase in expression was observed in medium larval stages (D-hinged larvae and veliger larvae), which was followed by a significant decrease of transcript number in spat ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4B).

In the library III, 6 genes were selected, *kunitz-like protease* inhibitor, *serpin*, *catalase*, *fasciclin 1*, *caveolin 3* and *calmodulin*. All these genes presented similar expression patterns (Fig. 5A), with low transcript number from oocytes to trochophore stage (*kunitz-like protease* inhibitor, *serpin*, *catalase* and *fasciclin 1*) or blastula stage (*caveolin 3* and *calmodulin*), and a significant increase in transcript number in medium larval stages (D-hinged larvae and veliger larvae), followed by a significant decrease in transcript number in spat ( $p < 0.05$ ).

Finally, among the genes isolated from the library IV, 4 genes were selected, *ferritin*, *cathepsin B*, *myc* homolog and *hsp27* (Fig. 5B). Whereas, the expression of *ferritin* increased progressively and significantly ( $p < 0.05$ ) from D-hinged larvae to spat, the expression pattern of *cathepsin B* showed a maximal expression in veliger larvae, followed by a progressive and significant ( $p < 0.05$ ) decrease of expression in other stages to spat. For *myc* homolog, a low transcript number from oocytes to veliger larvae was followed by an expression significant increase ( $p < 0.05$ ) in pediveliger larvae and an expression significant decrease ( $p < 0.05$ ) in two last stages (metamorphosing larvae and spat). The expression of *hsp27* was low during the development but a significant increase in transcript number was observed in spat ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

In order to isolate novel or specific genes differentially expressed during the oyster development, we constructed four SSH libraries, pool of various early stages (morula, blastula, gastrula) vs medium stage (D-hinged larvae) and medium stage (D-hinged larvae) vs later developmental stage (spat), both forward and reverse to cover the key stages during oyster development (Fig 1). The choice of these development stages were mainly dictated by our results previously obtained on the ontogenesis of the immune system of *C. gigas*, more particularly the apparition of hemocytes, immunocompetent cells, in gastrula-trochophore stages (Tirapé et al., 2007). Thus, the major maturation events leading to immunocompetence occurring between D-hinged larvae and veliger larvae, we decided to consider the D-hinged larvae like a reference stage for the library construction. The spat, 2 months after the metamorphosis, was selected since this stage is constituted of all the tissues present in adult (Elston, 1999).

Gene Ontology (GO) has been widely used to characterize gene function annotation and classification (Ashburner et al., 2000). GO describes gene function using controlled vocabulary and hierarchy including molecular function, biological processes, and cellular communication. The analysis of 668 sequences according to the putative gene function, led to a classification in 6 functional categories and a high frequency of not hits sequences. Great amounts of ESTs with no significant or no hit (about 70%) are very often found in studies presenting EST data in mollusk species ( Bultelle et al., 2002; Boutet et al., 2004; Huvet et al., 2004; Tanguy et al., 2004). The large percentage of novel sequences suggests the possibility of new genes specific to mollusks and potentially involved in various functions during ontogenesis. Among the functional categories, the metabolism category is the most represented in the four libraries. This is in agreement with a highly active metabolism during the development (Samanta et al., 2006). In addition, almost all the ESTs were found as a single gene suggesting a diversity of ESTs. However, individual ESTs could also represent either different regions within the same protein or closely related proteins.

##### **Genes up regulated in early developmental stages**

The gene number isolated in the library I corresponding to genes up-regulated in early developmental stages is relatively small compared to other libraries. This result can be explained by the transcriptional silence or the low transcriptional activity in the morula, blastula and gastrula stages (Tirapé et al., 2007). Moreover, differences of gene expression are observed between these three stages which could explain the weak expression difference of

pool of these early stages compared to D-hinged larvae deduced from the SSH results. Among the genes isolated in this library, *PP2A* inhibitor, expressed in all stages, could play a role in various functions during the development. Its substrate, PP2A is a major mammalian protein serine/threonine phosphatase involved in the regulation of various cellular processes (Janssens and Goris, 2001).

### **Genes up regulated in D-hinged larvae**

These genes issued from libraries II and III, belong to various functional categories and showed a differential expression in D-hinged larvae comparatively to other stages. Among the selected genes, we identified two membrane proteins (*caveolins 1* and *3*), a signaling molecule (*IκB*), two serine protease inhibitors (*serpin* and *Kunitz-like protease inhibitor*), two proteins implicated in cytotoxicity processes (*catalase*, *calmodulin*) and finally a cell adhesion molecule (*fasciclin*). The biological role of fasciclin proteins is not well characterized. In sea urchin, various fasciclin proteins have been identified in embryos and eggs and Sato et al., (Sato et al., 2004) showed that these proteins promote cell adhesion.

The caveolin gene family (*cav-1*, *cav-2* and *cav-3*) are believed to play a role in the invagination formation of the plasma membrane, called caveolae, acting as scaffolding proteins organizing and concentrating caveolin-interacting proteins and lipids in caveolae microdomains (Williams and Lisanti, 2004). Caveolins participate in many important cellular processes, including vesicular transport, signal transduction and tumor suppression. Recent studies demonstrated the caveolin role in diseases (Cohen et al., 2004) and more particularly, the caveolin 1 implication in innate immunity (Garrean et al., 2006; Medina et al., 2006). According to the various implications, the ubiquitous nature and diverse tissue expression of caveolin family in mammals, the caveolins could play a primordial role in oyster ontogenesis and more particularly in larval stages, according to the gene expression patterns studied.

*IκB* is a signaling molecule, which belongs to NF-κB pathway that does not match with the previously identified *Cg-IκB* from adult oyster hemocytes (Gueguen et al., 2003). This pathway is a common, evolutionarily conserved innate immune pathway that modulates the responses of animal cells to microbe-associated molecular patterns (Goodson et al., 2005). Several components of this pathway have been identified in adult *C. gigas* suggesting the existence of this pathway in oyster (Escoubas et al., 1999; Montagnani et al., 2004). Based on homology with the NF-κB pathway in mammals and insects, the function of the NF-κB pathway in oysters may serve to regulate genes that are involved in innate defense and/or development (Silverman and Maniatis, 2001; Hoffmann et al., 2002).

In molluscs, serine protease inhibitors are a group of humoral factors identified in hemolymph (Faisal et al., 1998; Ehab et al., 1999). The up-regulated mRNA expression of serine protease inhibitor in the scallop (*Argopecten irradians*) following injury or infection indicates that this gene may be involved in wound healing and the immune response (Zhu et al., 2006). In addition, serpin family, along with its proteases, has been demonstrated to play a role in coagulation and complement activation (Iwanaga and Kawabata, 1998). To date, more than 800 genes that encode serpins have been identified in plants, animals, viruses and prokaryotes (Silverman et al., 2001; Gettins, 2002). Serpins regulate various physiological processes and defense mechanisms (van Gent et al., 2003). Other EST, Kunitz-like protease inhibitor precursor belongs to the Kunitz super family which is characterized by the presence of Kunitz domains. Such domains are known to play a role in innate immunity regulating the extracellular activity of proteases, such as those released by neutrophils, during the host inflammatory response (Nile et al., 2006). Serine protease inhibitors in arthropod support host defense mechanisms by affording protection from a variety of proteases associated with pathogenic virulence (Kanost, 1999). In oyster, one EST homologous to serpin was identified from library constructed with mRNA coming from adult oyster hemocytes stimulated with bacteria (Gueguen et al., 2003) but no matches were found with this sequence. The protease inhibitors could play primordial role in immune response during ontogenesis and more particularly from D-hinged larvae according to their expression pattern in this study.

Two ESTs are homologous to proteins implicated in cytotoxicity processes. A catalase, enzyme implied in the degradation of hydrogen peroxide (Dounce, 1983) which is a reactive oxygen specie produce after the phagocytosis leading to the internalization of microorganisms in cells (Bogdan et al., 2000). In addition, catalase is involved in oxidative stress conferring resistance to oxidative damage during either development or adulthood (Sampayo et al., 2003). In bivalve mollusks, *Mytilus* and *Ruditapes*, the catalases are implicated in anti-oxidant system and oxidative stress (Pipe et al., 1993; Bebianno et al., 2004). The second EST is homologous to the *calmodulin* (CaM) gene which is known to associate and modulate the function of more than 50 target proteins, functioning as a central regulator of metabolism in all cells, including macrophages. In these cells, the association of CaM with inducible nitric oxide synthase (iNOS) is necessary for enzyme function and stabilization (Gribovskaja et al., 2005; Shen et al., 2005). The CaM/iNOS complex would play an important early role in the host immune response (Smallwood et al., 2006). In adult oyster, *C. gigas*, the cytotoxicity processes have been described (Bachère et al., 1991) and the implication of cytotoxic

molecules, like superoxide dismutase, has been demonstrated in immune response (Gonzalez et al., 2005; Labreuche et al., 2006).

### **Genes up regulated in spat**

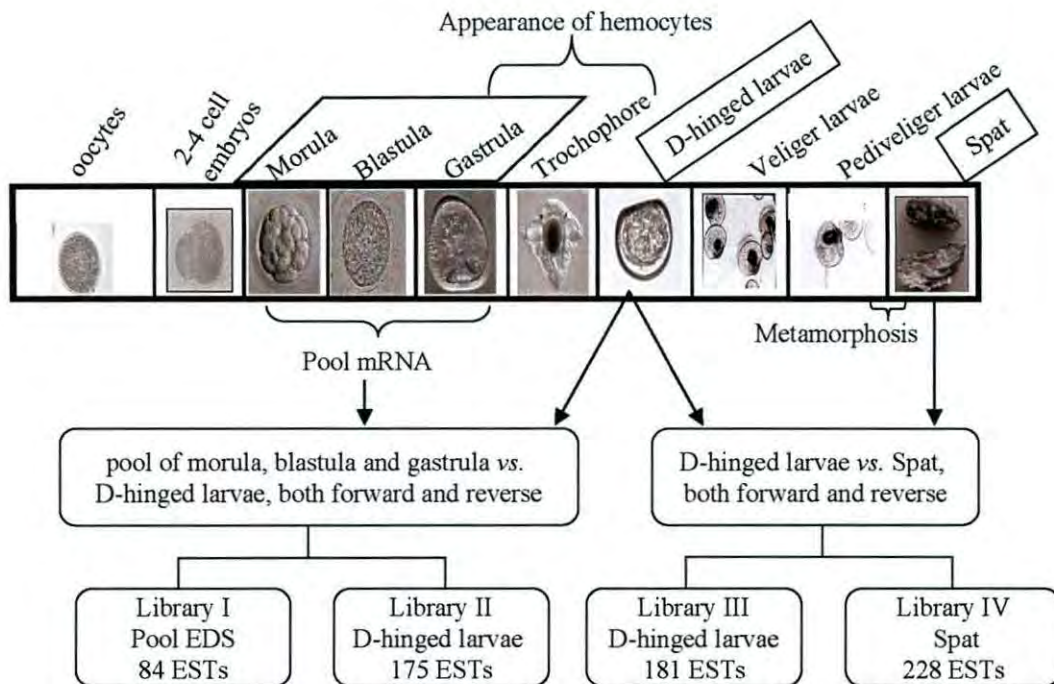
In library IV, we identified genes preferentially expressed in spat compared to D-hinged larvae. During oyster development two gene expression patterns were observed (i) a high expression level in spat compared to previous stages for *hsp27* and *ferritin*, (ii) a high expression level in pediveliger or veliger larvae compared to other stages for *myc* homolog and *cathepsin B*, respectively. However the differential expression for these genes was confirmed between spat and D-hinged larvae. Heat shock proteins (Hsp) are chaperones that play an essential role in embryogenesis, tissue maintenance and injury response (Basu et al., 2002; Walsh et al., 1999). Hsp27 belongs to the small heat shock protein family, in which the expression is constitutive in many adult tissues and during the development in a tissue-specific manner (Mao et al., 2005; Mao and Shelden, 2006). Ferritin has two main functions, iron detoxification and iron storage. Ferritin has been suggested as being an acute phase protein responding to a nonlethal injury in echinoderm (Beck et al., 2002). In addition, several datas support that ferritin protect against oxidative stress by sequestering intracellular iron (Orino et al., 2001). In adult oyster, a *ferritin* gene was previously isolated from hemocytes and its expression was not affected after bacterial challenge (Gueguen et al., 2003).

During oyster development, *myc* homolog transcripts were detected in pediveliger larvae just before metamorphosis followed by a significant transcript decrease in spat. Before and during metamorphosis, drastic morphological changes affect the specific larval organs (Bayne, 1965). These results suggested that *myc* homologue plays an important role in tissue remodeling during the oyster metamorphosis. The *myc* homolog belongs to the proto-oncogene family and is involved in the control of cell division and thus is able to elicit the adverse process and programmed cell death (Evan et al., 1992). At this time, little is known about the *myc* homolog in mollusks, although it appeared up regulated in adult *C. gigas* after hydrocarbon exposure (Boutet et al., 2004).

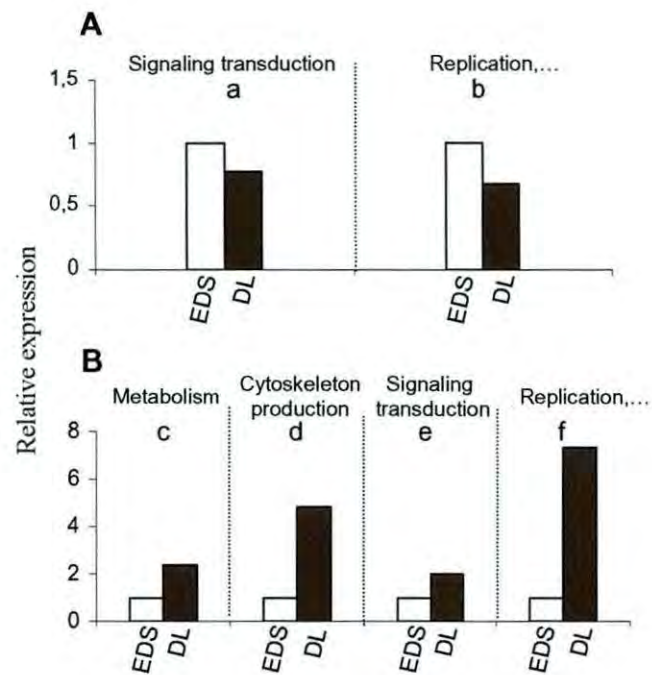
Finally, a lysosomal cysteine protease corresponding to a cathepsin B was isolated. One cathepsin was previously identified in EST library from adult oyster hemocytes (Gueguen et al., 2003) but this cathepsin seems different according to sequences homology. The cysteine proteases, in developing embryos, are often found in the cytoplasm and extracellular matrix where they may have regulatory functions and play a role in intracellular protein turnover and degradation (Kirschke, 1998). In addition, these proteases are also known to be involved in

many pathological processes, such as inflammation where they are highly up-regulated (Frlan and Gobec, 2006) and programmed cell death (Chwieralski et al., 2006).

The current results have led to identify genes that are available to study the immune response of oyster during the developmental stages according to gene expression patterns and their expression localization, more particularly after stresses. These genes will be candidates like potential immune markers to understand the differences of susceptibility to stress observed between the embryos, larvae, juveniles and adults.

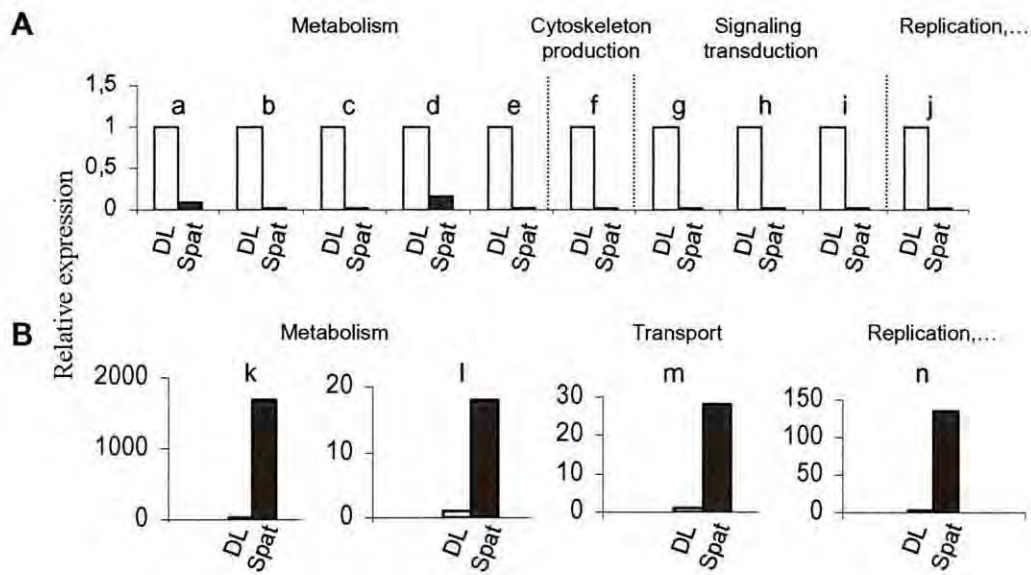


**Fig. 1.** Diagram of four SSH library (Suppressive Subtractive Hybridization) construction, performed during the *Crassostrea gigas* ontogenesis.

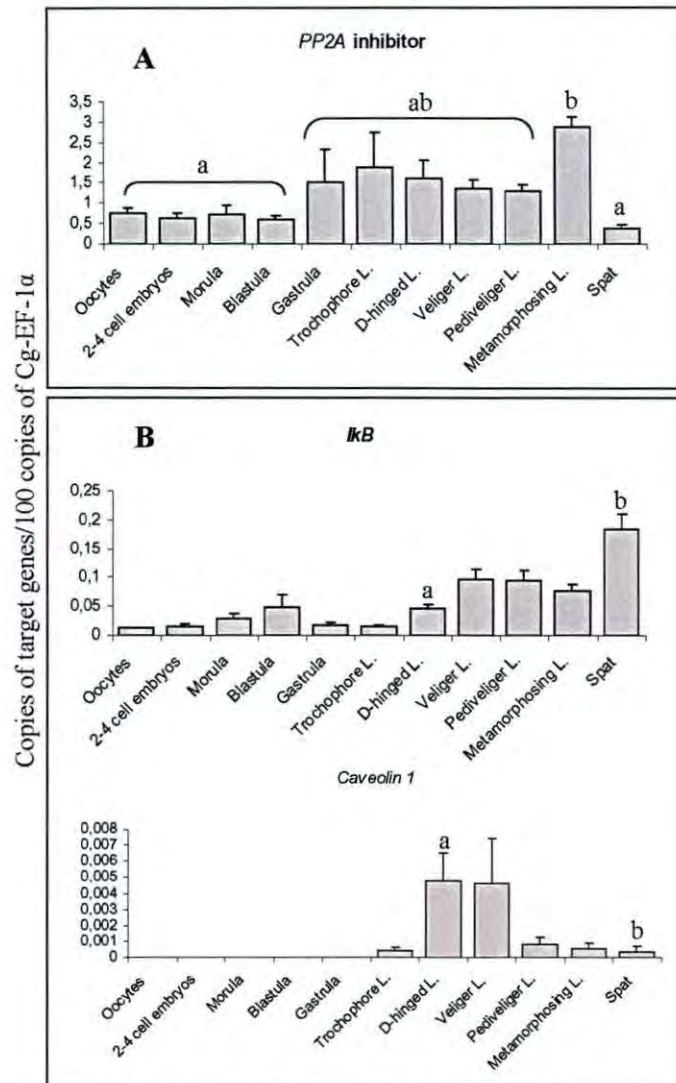


**Fig. 2.** Relative expression of genes differential expressed from a pool of morula, blastula and gastrula stages and from D-hinged larvae, determined using real-time quantitative PCR. Equal amount of cDNAs were used for this analysis for each samples. Genes are representative of the different functional categories identified in the libraries. **A.** Library I: **a** *pannexin*, **b** *PP2A* inhibitor. **B.** Library II: **c** *hsp40*, **d** *caveolin 1*, **e** *IκB*, **f** *myc* homolog. DL: D-hinged larvae, EDS: early developmental stages.

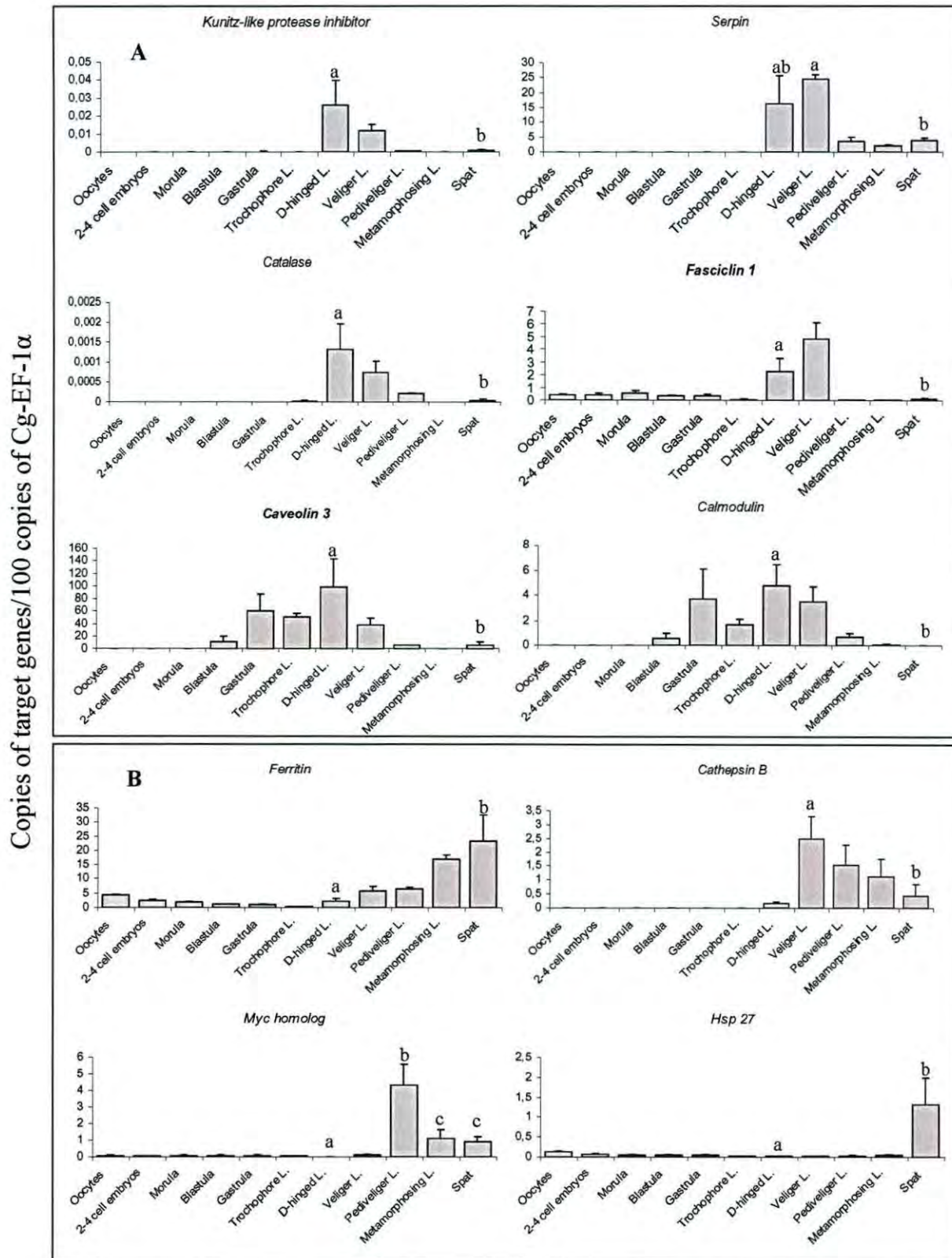




**Fig. 3.** Relative expression of genes differential expressed from D-hinged larvae and spat, determined using real-time quantitative PCR. Equal amount of cDNAs were used for this analysis for each samples. Genes are representative of the different functional categories identified in the libraries. **A.** Library III: **a** *chaperonin 1*, **b** *chitinase*, **c** *catalase*, **d** *serpin*, **e** *kunitz-like protease inhibitor*, **f** *caveolin 1*, **g** *caveolin 3*, **h** *fasciclin 1*, **i** *Calmodulin*, **j** *histone 2A*. **B.** Library IV: **k** *hsp27*, **l** *cathepsin B*, **m** *ferritin*, **n** *myc homolog*. DL: D-hinged larvae.



**Fig. 4.** Expression patterns of genes differentially expressed during *Crassostrea gigas* ontogenesis by quantitative real time PCR. **A.** Library I (D-hinged larvae “driver”/pooled early development stages “tester”) and **B.** Library II (D-hinged larvae “tester”/pooled early development stages “driver”). Each value is the mean  $\pm$  standard error of embryo or larvae pools from three spawns and three individual spats. Different letters indicate significant differences between gene expression ( $p < 0.05$ ). L: larvae.



**Fig. 5.** Expression patterns of genes differentially expressed during *Crassostrea gigas* ontogenesis by quantitative real time PCR. **A.** Library III (D-hinged larvae “tester”/Spat “driver”) and **B.** Library IV (D-hinged larvae “driver”/Spat “tester”). Each value is the mean  $\pm$  standard error of embryo or larvae pools from three spawns and three individual spats. Different letters indicate significant differences between gene expression ( $p < 0.05$ ). L: larvae.

Table 1  
Sequences of forward and reverse primers used for real-time quantitative PCR and annealing conditions.

Putative match	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Amplicon size (bp)	Annealing (°C)
<i>panmexin</i>	ATGGTCTCTTCTGTTC	TGTAGTTATCCGCCATC	151	62
<i>PP2A inhibitor</i>	AGCCCTACAGTTTCTCAC	CTTCCACTCTTCCACTT	187	62
<i>hsp 40</i>	CTATCACTAAATCTCCCTTC	GGGTCCAAATAATGTCC	274	62
<i>IκB</i>	ATACTCTACTCCATCTC	GCCCCATTGTCTAATAA	165	63
<i>chaperonin 1</i>	GATGTGTTTCAGAGTTCA	TTAGGTAGCAATCACTGG	194	62
<i>chitinase</i>	CAGACGATTTGTCCAT	TGTCCAGTAGAGGTTTGT	108	62
<i>catalase</i>	GATTGTCCTGCTTGTA	ACTTGTCGTGTAGCCATA	159	63
<i>serpin</i>	GCACTCGTTGTTGTATGT	CTTGTGGTGTTAGAGCAG	227	62
<i>kunitz-like protease inhibitor</i>	GAGAGTGAGGAGGAGATA	CCTACAGAGTTTGAGCAC	208	63
<i>caveolin 1</i>	CGTCTCTATGCTATGTG	TATCTCCCGTTCTGTTT	145	58
<i>caveolin 3</i>	GATGTAGGCAAACCTCAC	ATCCCAACTCTCTGAAC	204	62
<i>fasciclin 1</i>	CGATTCTTCCTCTCTGTT	CCTTTGGTGGTAGTTTG	197	62
<i>calmodulin</i>	ATCAACTCACCAGAAGAAC	GTTTCCATCAGCATCAA	179	62
<i>histone 2A</i>	GATGAGGTGAAAGATGA	AGAGGAGACGAAGAGTTG	247	62
<i>hsp 27</i>	CAACATCATTCCGTCAG	ATTTACTTGTCTCTTCCTC	188	62
<i>cathepsin B</i>	AAAGATGCTTCGTCTAG	TGTGTTTCTCAATCAGTC	184	62
<i>ferritin</i>	ATACTCTCCCAGCCACT	TCTCTGCTTGACCTTC	169	62
<i>myc homolog</i>	ATGTTCTGGTGAGTGTT	CAGTTGTTGATACGGTTG	274	62
<i>galectine 8</i>	CTATGACGGGATGTTGA	TGTTCTGTTCTGCCATT	188	60

Table 2.  
General characteristic of four SSH (suppression subtractive hybridization) libraries from several development stages of *Crassostrea gigas*.

	Library I	Library II	Library III	Library IV
Total number of cDNAs sequenced	192	287	480	480
Total number of cDNAs analyzed <sup>a</sup>	77	196	321	397
Singletons	46	115	117	157
EST contig	38	60	64	71
Redundancy <sup>b</sup>	49.3%	30.6%	19.9%	17.8%
Average insert size (range for four SSH libraries)	770 bp (200-1200)			
Average EST length (for four SSH libraries)	550 bp			
Functional Categories	%	%	%	%
No hits	64.3	60.6	70.7	61.0
Unknown	11.9	13.1	8.8	8.8
Immunity	0.0	0.6	0.0	0.0
Metabolism	13.1	9.1	7.2	17.5
Signaling transduction	3.6	5.1	7.2	3.1
Replication, repair, transcription, translation	2.4	3.4	2.2	4.8
Cytoskeleton production and maintenance	2.4	6.3	3.9	3.1
Transport	2.4	1.7	0.0	1.8

EST, expressed sequences tags. <sup>a</sup>Length of sequence used for comparison after editing (inserts < 150 base pair were excluded). <sup>b</sup>Redundancy = number of ESTs assembled in contig/total ESTs. Library I= D-hinged larvae "driver"/pooled early development stages "tester"; Library II= D-hinged larvae "tester"/pooled early development stages "driver"; Library III=D-hinged larvae "tester"/Spat "driver" and Library IV=D-hinged larvae "driver"/Spat "tester".

Table 3.

Upregulated genes identified in library I, D-hinged larvae "driver" and pool of morula, blastula and gastrula "tester"

Homologue protein	E value	Closest species (GenBank Acc N°)	N° ESTs clon
<b>Metabolism</b>			
acyl-coenzyme A binding protein,	4,00E-12	<i>Gallus gallus</i> 1478490	1
calcium binding atopy-related autoantigen 1	7,00E-37	<i>Homo sapiens</i> 11386185	1
chaperonin containing TCP1 subunit 8	2,00E-62	<i>Oncorhynchus mykiss</i> 60223025	1
cytochrome b	1,00E-122	<i>Crassostrea gigas</i> GI7212447	1
F1 ATP synthase beta subunit	2,00E-10	<i>Gillichthys mirabilis</i> 16517084	1
methionine adenosyltransferase	5,00E-60	<i>Modiolus americanus</i> 46909381	1
NADH dehydrogenase	1,00E-112	<i>Crassostrea gigas</i> 7212451	1
NADH dehydrogenase	1,00E-42	<i>Lysiphlebus testaceipes</i> 40882445	1
Proteinase inhibitor I4, serpin	5,00E-19	<i>Chlorobium limicola</i> 67917785	1
ribosomal protein L18	9,00E-77	<i>Crassostrea gigas</i> 40642992	1
ribosomal protein S5	3,00E-72	<i>Crassostrea gigas</i> 40643036	1
<b>Signaling transduction</b>			
CG2198-PB, isoform B	1,00E-07	<i>Drosophila melanogaster</i> 45446406	1
Guanine nucleotide-binding protein G(o) alpha subunit	1,00E-116	<i>Mizuhopecten yessoensis</i> 3023823	1
pannexin 3	4,00E-06	<i>Aplysia californica</i> 54398904	1
<b>Replication, repair, transcription, translation</b>			
PP2A inhibitor	1,00E-46	<i>Tetraodon fluviatilis</i> 2253411	1
PREDICTED: similar to Small nuclear ribonucleoprotein F	5,00E-35	<i>Rattus norvegicus</i> 62652156	1
<b>Cytoskeleton production and maintenance</b>			
GA19067-PA	6,00E-21	<i>Caenorhabditis elegans</i> 54642040	1
troponin T	9,00E-30	<i>Mizuhopecten yessoensis</i> 2196556	1
<b>Transport</b>			
CG15828-PA, isoform A	2,00E-23	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72020023	1
hypothetical protein Acetyl-CoA acetyltransferase	2,00E-67	<i>Pongo pygmaeus</i> 55730408	1
<b>unknown</b>			10
<b>No Hits</b>			54

84

Table 4.

Upregulated genes identified in library II, D-hinged larvae "tester" and pool of morula, blastula and gastrula "driver"

Homologue protein	E value	Closest species (GenBank Acc N°)	N° ESTs clon
<b>Immunity</b>			
PREDICTED: similar to Galectin-8	7,00E-10	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> XP72113732	1
<b>Metabolism</b>			
ATP synthase beta	2,00E-28	<i>Drosophila simulans</i> 34420426	1
cytochrome b	1,00E-122	<i>Crassostrea gigas</i> G17212447	1
cytochrome c oxidase subunit I	1,00E-102	<i>Crassostrea gigas</i> 7212457	1
heat shock protein 40	4,00E-29	<i>Ciona intestinalis</i> 74096171	1
H+-transporting ATP synthase alpha subunit isoform 1	2,00E-87	<i>Myxine glutinosa</i> 28630330	1
selenium dependent salivary glutathione peroxidase	3,00E-39	<i>Ixodes scapularis</i> 67083759	1
Sulfatase modifying factor 1	3,00E-63	<i>Mus musculus</i> 20073363	1
SJCHGC05482 protein (Chaperonin HSP60)	1,00E-45	<i>Schistosoma japonicum</i> 76154730	1
RH59487p	1,00E-42	<i>Drosophila melanogaster</i> 40882445	1
ribosomal protein L22	1,00E-12	<i>Argopecten irradians</i> G122758850	1
ribosomal protein S6	5,00E-31	<i>Culicoides sonorensis</i> G156199524	1
PREDICTED: similar to Aminopeptidase N (hAPN) (Alanylaminopeptidase)	2,00E-18	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72099820	1
PREDICTED: similar to eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma	1,00E-48	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72007072	1
PREDICTED: similar to fibrocystin L	2,00E-66	<i>Homo sapiens</i> XP68391947	1
PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S2	2,00E-26	<i>Mus musculus</i> G182899765	1
PREDICTED: similar to heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase 4	2,00E-33	<i>Gallus gallus</i> 50755845	1
<b>Signaling transduction</b>			
Beta-Ig-H3/fasciclin CU	2,00E-16	<i>Methanosarcina barkeri str. fusaro</i> G168134316	1
dopamine receptor	6,00E-04	<i>Takifugu rubripes</i> 1204088	1
inhibitor of nuclear factor kappaB	7,00E-31	<i>Euprymna scolopes</i> 63034007	1
Phospholipid scramblase 1 PLSCR1 protein	3,00E-34	<i>Homo sapiens</i> 18088890	1
sarcoplasmic calcium-binding protein	3,00E-05	<i>Mizuhopecten yessoensis</i> 6692814	1
PREDICTED: similar to CUB and sushi multiple domains protein 1 precursor	2,00E-33	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72004534	1
PREDICTED: similar to nuclear receptor-like, contains ligand-binding domain but no obvious zinc finger family member	4,00E-15	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72017415	1
PREDICTED: similar to phosphodiesterase 10A, partial	4,00E-21	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72164818	1
PREDICTED: similar to tetratricopeptide repeat domain 10, partial	5,00E-35	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72153533	1
<b>Replication, repair, transcription, translation</b>			
CG2807-PA	2,00E-56	<i>Drosophila melanogaster</i> 45445002	1
H2A histone family, member V, isoform 1	3,00E-29	<i>Homo sapiens</i> 48257076	1
Myc homolog	3,00E-20	<i>Crassostrea virginica</i> 957315	1
putative reverse transcriptase	4,00E-12	<i>Cicer arietinum</i> G127475622	1
Xbp1-prov protein	0.005	<i>Xenopus laevis</i> 27696349	1
PREDICTED: similar to Kruppel-like factor 2 (Lung kruppel-like factor)	7,00E-14	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72015106	1
<b>Cytoskeleton production and maintenance</b>			
actin	5,00E-76	<i>Alluroteuthis antarcticus</i> 8895899	1
alpha-tubulin isotype 2	2,00E-58	<i>Paracentrotus lividus</i> 1245776	1
caveolin 1	6,00E-21	<i>Macropus eugenii</i> 74318880	1
Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	5,00E-71	<i>Danio rerio</i> 33416850	1
fibroblast growth factor receptor 1 isoform 5	5,00E-11	<i>Danio rerio</i> 28630931	1
gelsolin	5,00E-22	<i>Suberites ficus</i> 41349563	1
Tubulin, alpha 1	7,00E-41	<i>Mus musculus</i> 53733821	1
PREDICTED: corneal wound healing-related protein partial	1,00E-50	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72139620	1
PREDICTED: advillin, partial	6,00E-49	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72017425	1
PREDICTED: clathrin, light polypeptide A isoform a	5,00E-20	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72136156	1
PREDICTED: Dynein intermediate chain 2, cytosolic (DHIC-2)	8,00E-36	<i>Danio rerio</i> 68365694	1
<b>Transport</b>			
SJCHGC02792 protein or mitochondrial ADP/ATP translocator protein	1,00E-53	<i>Schistosoma japonicum</i> 56754309	1
Tuftelin interacting protein 11	8,00E-32	<i>Homo sapiens</i> G121619831	1
Voltage-dependent anion channel 3	2,00E-11	<i>Rattus norvegicus</i> G138512108	1
<b>unknown</b>			23
<b>No Hits</b>			106

Table 5.

Upregulated genes identified in library III, D-hinged larvae "tester" and Spat "driver"

Homologue protein	E value	Closest species (GenBank Acc N°)	N° ESTs clon
<b>Metabolism</b>			
catalase (EC 1.11.1.6) CAT-2	0.006	2117614	1
chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)	1,00E-04	<i>Danio rerio</i> 37362194	1
chitinase	0.22	<i>Tenebrio molitor</i> 21038943	1
cytochrome c oxidase subunit II	3,00E-18	<i>Crassostrea gigas</i> 7212448	1
cytochrome c oxidase	1,00E-102	<i>Crassostrea gigas</i> 7212457	1
CG7580-PA	0.007	<i>Drosophila melanogaster</i> 7293979	2
ENSANGP00000021586	2,00E-08	<i>Anopheles gambiae</i> 55239541	2
Kunitz-like protease inhibitor precursor	8,00E-03	<i>Ancylostoma caninum</i> 22901764	1
ribosomal protein L13	2,00E-18	<i>Ictalurus punctatus</i> 15293893	1
serine protease inhibitor 1(Serpin)	4,00E-28	<i>Argopecten irradians</i> 61105830	1
PREDICTED: similar to nucleoredoxin	1,00E-29	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72012368	1
<b>Signaling transduction</b>			
Calmodulin	3,00E-34	<i>Metridium senile</i> 49066052	2
caveolin 3	2,00E-10	<i>Danio rerio</i> 45387883	1
caveolin-3	3,00E-08	<i>Xenopus laevis</i> 21728332	1
dopamine receptor	6,00E-04	<i>Takifugu rubripes</i> 1204088	1
GA22070-PA	2,00E-31	<i>Drosophila pseudoobscura</i> 54636882	1
Fasciclin I	8,00E-12	<i>Gloeobacter violaceus</i> 35212717	1
sarcoplasmic calcium-binding protein	1,00E-20	<i>Mizuhopecten yessoensis</i> 6692814	1
putative cell adhesion protein Sym32	1,00E-10	<i>Anthopleura elegantissima</i> 7638019	2
putative FK506-binding protein	2,00E-18	<i>Suberites ficus</i> 46019950	1
PREDICTED: similar to hypothetical protein	6,00E-07	<i>Gallus gallus</i> 50732928	2
<b>Replication, repair, transcription, translation</b>			
ENSANGP00000021121 (LSm6)	5,00E-13	<i>Anopheles gambiae</i> 55238130	1
H2A histone family, member V, isoform 1	3,00E-29	<i>Homo sapiens</i> 48257076	1
LOC496235 protein	8,00E-15	<i>Xenopus laevis</i> 56789790	1
PREDICTED: similar to ENSANGP00000003971	1,00E-49	<i>Apis mellifera</i> 66513194	1
<b>Cytoskeleton production and maintenance</b>			
axonemal dynein light chain p33	2,00E-48	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 47551013	1
beta-tubulin	3,00E-14	<i>Mus musculus</i> 202229	1
caveolin 1	6,00E-21	<i>Macropus eugenii</i> 74318880	2
PREDICTED: similar to dynein light chain-2	2,00E-07	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72151102	1
PREDICTED: similar to dynein light chain-2	5,00E-18	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72046933	1
EFHC1	5,00E-07	<i>Xenopus laevis</i> 59803954	1
<b>unknown</b>			16
<b>No Hits</b>			128

181



Table 6.

Upregulated genes identified in library IV, D-hinged larvae "driver" and Spat "tester"

Homologue protein	E value	Closest species (GenBank Acc N°)	N° ESTs clon
<b>Metabolism</b>			
catalase	0.009	<i>Campylobacter jejuni</i> (984737)	1
Cathepsin B	5,00E-07	<i>Mus musculus</i> 45946482	1
cytochrome b	1,00E-122	<i>Crassostrea gigas</i> 7212447	1
delta-9-desaturase 1	2,00E-12	<i>Takifugu rubripes</i> 53689933	1
E3 ubiquitin-protein ligase	1,00E-51	<i>Mya arenaria</i> 7524150	1
heat shock protein 1	5,00E-04	<i>Danio rerio</i> 956693302	1
NADH dehydrogenase subunit 6	7,00E-48	<i>Crassostrea gigas</i> 47212453	1
NADH dehydrogenase	2,00E-44	<i>Crassostrea gigas</i> 7212452	2
putative fructose 1,6-bisphosphate aldolase	4,00E-14	<i>Homalodisca coagulata</i> 46561746	1
tyrosinase precursor 2	5,00E-19	<i>Illex argentimus</i> 34850933	1
Zgc:92114	2,00E-48	<i>Danio rerio</i> 50369260	1
hypothetical protein LOC550451	5,00E-28	<i>Danio rerio</i> 62955483	1
Hypothetical protein mgc108244	1,00E-35	<i>Xenopus tropicalis</i> 366794629	1
ribosomal protein L	3,00E-42	<i>Argopecten irradians</i> 22758874	1
ribosomal protein L5	3,00E-29	<i>Crassostrea gigas</i> 40642990	1
ribosomal protein L7	2,00E-57	<i>Crassostrea gigas</i> 32169292	2
ribosomal protein L7a	1,00E-37	<i>Argopecten irradians</i> 22758896	2
ribosomal protein L9	3,00E-26	<i>Argopecten irradians</i> 22758894	1
ribosomal protein L12	6,00E-43	<i>Argopecten irradians</i> 22758902	2
Ribosomal protein L13	1,00E-04	<i>Danio rerio</i> 50370041	1
60S ribosomal protein L13A	2,00E-52	<i>Mytilus edulis</i> 76573377	1
Ribosomal L15	1,00E-48	<i>Danio rerio</i> 50369260	1
ribosomal protein L18	9,00E-77	<i>Crassostrea gigas</i> 40642992	1
ribosomal protein L26	3,00E-16	<i>Mus musculus</i> 56205563	1
ribosomal protein P1	2,00E-16	<i>Biomphalaria glabrata</i> 71726733	1
ribosomal protein S3a	7,00E-44	<i>Crassostrea gigas</i> 40642988	1
ribosomal protein S4e	6,00E-24	<i>Sphaerius sp</i> 70909489	1
ribosomal protein S6	5,00E-31	<i>Culicoides sonorensis</i> 56199524	1
PREDICTED: similar to ribosomal protein L7a	5,00E-03	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72014923	1
PREDICTED: similar to ribosomal protein S9-like	1,00E-64	<i>Pan troglodytes</i> 55649873	1
PREDICTED: similar to CG11015-PA	0.0012	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72009818	1
PREDICTED: similar to cathepsin L, a isoform 2	4,00E-38	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72027918	1
Rpl15-prov protein	2,00E-31	<i>Xenopus laevis</i> 49670582	2
substrate-specific endoprotease	2,00E-12	<i>Comus textile</i> 32187775	2
<b>Signaling transduction</b>			
baculoviral IAP repeat-containing protein 3	7,00E-06	<i>Homo sapiens</i> 33946285 <i>Branchiostoma belcheritsingtaunese</i> 47933716	1
ependymin related protein-1 precursor	0.0048	<i>Theileria annulata</i> 65305542	1
integral membrane protein, putative	5,00E-03	<i>Homo sapiens</i> 61743978	1
stabilin 1 precursor	2,00E-03	<i>Pan troglodytes</i> 55636227	1
PREDICTED: similar to Muscarinic acetylcholine receptor	2,00E-03	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72084241	1
PREDICTED: similar to Notch gene homolog 1	7,00E-03	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 72084241	1
PREDICTED: similar to Receptor-type tyrosine-protein phosphatase	2,00E-05	<i>Danio rerio</i> 68361658	1
<b>Replication, repair, transcription, translation</b>			
Hypothetical protein CBG09566 ( 60 kDa Ro protein)	5,00E-05	<i>Caenorhabditis briggsae</i> 39593305	1
Myc homolog	3,00E-20	<i>Crassostrea virginica</i> 957315	2
putative reverse transcriptase	9,00E-05	<i>Cicer arietinum</i> 27475622	2
PREDICTED: similar to ENSANGP00000026584	6,00E-44	<i>Apis mellifera</i> 66551870	1
PREDICTED: similar to Small nuclear ribonucleoprotein	5,00E-35	<i>Rattus norvegicus</i> 62652156	1
PREDICTED: similar to DNA topoisomerase I	6,00E-05	<i>Apis mellifera</i> 66519959	2

PREDICTED: similar to topoisomerase I beta isoform 3	2,00E-13	<i>Danio rerio</i> 68369118	1
PREDICTED:similar toENSANGP00000014714	9,00E-79	<i>Apis mellifera</i> 66534191	1
<b>Cytoskeleton production and maintenance</b>			
alpha-tubulin isotype 2	2,00E-58	<i>Paracentrotus lividus</i> 1245776	1
collagen	1,00E-06	<i>Brugia pahangi</i> 1222642	1
Cuticle collagen 8 precursor	0.0027	<i>Caenorhabditis elegans</i> 115404	1
cytoplasmic intermediate filament protein A	5,00E-14	<i>Aplysia californica</i> G165584	1
MGC84748 protein ( Fibrinogen like 2)	3,00E-05	<i>Xenopus laevis</i> 49257708	1
tubulin beta chain	6,00E-04	<i>Ophiostoma minus</i> 45359868	1
PREDICTED: similar to Collagen alpha 2(IV) chain precursor	0.003	<i>Danio rerio</i> 68365720	1
<b>Transport</b>			
Collagen triple helix repeat	0.004	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> 67548196	1
<b>ferritin</b>	3,00E-13	<i>Crassostrea gigas</i> 40643026	1
hypothetical protein LOC415141	1,00E-30	<i>Danio rerio</i> 50344756	1
PREDICTED: similar to glutamate transporter 1	5,00E-04	<i>Danio rerio</i> 68368537	1
<b>unknown</b>			20
<b>No Hits</b>			139
			228

**References**

- Arzul, I., T. Renault, and C. Lipart. 2001. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Dis Aquat Organ.* 46: 1-6.
- Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, and G. Sherlock. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature.* 25: 25-29.
- Bachère, E., V. Boulo, P. Godin, L. Goggin, D. Hervio, G. Le Gall, A. Morvan, and E. Mialhe. 1991. *In vitro* chemiluminescence studies of marine bivalve defence mechanisms and responses against specific pathogens. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 102.
- Basu, N., A.E. Todgham, P.A. Ackerman, M.R. Bibeau, K. Nakano, P.M. Schulte, and G.K. Iwama. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene.* 295: 173-183.
- Bayne, B. 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia.* 2: 1-47.
- Bebiano, M., F. Geret, P. Hoarau, M. Serafim, M. Coelho, M. Gnassia-Barelli, and M. Romeo. 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers.* 9: 305-330.
- Beck, G., T.W. Ellis, G.S. Habicht, S.F. Schluter, and J.J. Marchalonis. 2002. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Developmental & Comparative Immunology.* 26: 11-26.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology.* 12: 64-76.
- Boutet, I., A. Tanguy, and D. Moraga. 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene.* 329: 147-157.
- Boutet, I., A. Tanguy, S. Rousseau, M. Auffret, and D. Moraga. 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: 76-85.
- Bultelle, F., M. Panchout, F. Leboulenger, and J.M. Danger. 2002. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. *Marine Environmental Research.* 54: 385-389.

- Chwieralski, C.E., T. Welte, and F. Bühling. 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*. 11: 143-149.
- Cohen, A.W., R. Hnasko, W. Schubert, and M.P. Lisanti. 2004. Role of Caveolae and Caveolins in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 84: 1341-1379.
- David, E., A. Tanguy, K. Pichavant, and D. Moraga. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal*. 272: 5635-5652.
- Dounce, A. 1983. A proposed mechanism for the catalytic action of catalase. *J Theor Biol*. 105: 553-567.
- Ehab, W., M. Shawn, and F. Mohamed. 1999. Protease inhibitors in plasma of the softshell clam *Mya arenaria*: identification and effects of disseminated sarcoma. *Comp Biochem Physiol*. 123: 427-435.
- Elston, R. 1999. Health management, development and histology of seed oysters. The World Aquaculture Society, Louisiana USA.
- Escoubas, J.-M., L. Briant, C. Montagnani, S. Hez, C. Devaux, and P. Roch. 1999. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Letters*. 453: 293-298.
- Evan, G.I., A.H. Wyllie, C.S. Gilbert, T.D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C.M. Waters, L.Z. Penn, and D.C. Hancock. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 69: 119-128.
- Fabioux, C., S. Pouvreau, F.L. Roux, and A. Huvet. 2004. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 315: 897-904.
- Faisal, M., E.A. MacIntyre, K.G. Adham, B.D. Tall, M.H. Kothary, and J.F. La Peyre. 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*. 121: 161-168.
- Frlan, R. and S. Gobec. 2006. Inhibitors of Cathepsin B. *Current Medicinal Chemistry*. 13: 2309-2327.
- Garrean, S., X.-P. Gao, V. Brovkovich, J. Shimizu, Y.-Y. Zhao, S.M. Vogel, and A.B. Malik. 2006. Caveolin-1 Regulates NF- $\kappa$ B Activation and Lung Inflammatory Response to Sepsis Induced by Lipopolysaccharide. *J Immunol*. 177: 4853-4860.
- Gettins, P.G.W. 2002. Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chem. Rev.* 102: 4751-4804.

- Gonzalez, M., B. Romestand, J. Fievet, A. Huvet, M.-C. Lebart, Y. Gueguen, and E. Bachere. 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338: 1089-1097.
- Goodson, M., M. Kojadinovic, J. Troll, T. Scheetz, T. Casavant, M. Soares, and M. McFall-Ngai. 2005. Identifying components of the NF-kappaB pathway in the beneficial *Euprymna scolopes-Vibrio fischeri* light organ symbiosis. *Appl Environ Microbiol*. 71: 6934-6946.
- Gouletquer, P., P. Soletchnik, O. Le Moine, D. Razet, P. Geairon, N. Faury, and S. Taillade. 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes Oléron (France). ICES Mariculture Committee CM1998/CC.: 14-21.
- Gribovskaja, I., K.C. Brownlow, S.J. Dennis, A.J. Rosko, M.A. Marletta, and R. Stevens-Truss. 2005. Calcium-Binding Sites of Calmodulin and Electron Transfer by Inducible Nitric Oxide Synthase. *Biochemistry*. 44: 7593 - 7601.
- Gueguen, Y., J.P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguiere, A.-L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachere, and J.M. Escoubas. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*. 303: 139-145.
- Gueguen, Y., A. Herpin, A. Aumelas, J. Garnier, J. Fievet, J.-M. Escoubas, P. Bulet, M. Gonzalez, C. Lelong, P. Favrel, and E. Bachere. 2006. Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*: Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J. Biol. Chem*. 281: 313-323.
- Hoffmann, A., A. Levchenko, M.L. Scott, and D. Baltimore. 2002. The Ikappa B-NF-kappa B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. *Science*. 298: 1241-1245.
- Huvet, A., A. Herpin, L. Degremont, Y. Labreuche, J.F. Samain, and C. Cunningham. 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.
- Iwanaga, S. and S.-i. Kawabata. 1998. Evolution and phylogeny of defence molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Frontiers in Bioscience*. 3: 973-984.
- Janssens, V. and J. Goris. 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J*. 353: 417-439.

- Jenny, M.J., R.W. Chapman, A. Mancina, Y.A. Chen, D.J. McKillen, H. Trent, P. Lang, J.-M. Escoubas, E. Bachere, V. Boulo, Z.J. Liu, P.S. Gross, C. Cunningham, P.M. Cupit, A. Tanguy, X. Guo, D. Moraga, I. Boutet, A. Huvet, S. De Guise, J.S. Almeida, and G.W. Warr. In Press. A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*.
- Jenny, M.J., A.H. Ringwood, E.R. Lacy, A.J. Lewitus, J.W. Kempton, P.S. Gross, G.W. Warr, and R.W. Chapman. 2002. Potential Indicators of Stress Response Identified by Expressed Sequence Tag Analysis of Hemocytes and Embryos from the American Oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology*. 4: 81-93.
- Jenny, M.J., A.H. Ringwood, K. Schey, G.W. Warr, and R.W. Chapman. 2004. Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *European Journal of Biochemistry*. 271: 1702-1712.
- Kanost, M.R. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental & Comparative Immunology*. 23: 291-301.
- Kirschke, H. 1998. Cathepsin L. *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barret, A.J., Rawlings, N.D., & Woessner, J.F., eds). Academic Press, San Diego.
- Labreuche, Y., C. Lambert, P. Soudant, V. Boulo, A. Huvet, and J.-L. Nicolas. 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection*. 8: 2715-2724.
- Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet, J.-L. Nicolas, and F. Berthe. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*. 15: 251-258.
- Li, S., L. Xie, C. Zhang, Y. Zhang, M. Gu, and R. Zhang. 2004. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 138: 235-243.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 25: 402-408.
- Mao, L., A.L. Bryantsev, M.B. Chechenova, and E.A. Shelden. 2005. Cloning, characterization, and heat stress-induced redistribution of a protein homologous to human hsp27 in the zebrafish *Danio rerio*. *Experimental Cell Research*. 306: 230-241.

- Mao, L. and E.A. Shelden. 2006. Developmentally regulated gene expression of the small heat shock protein Hsp27 in zebrafish embryos. *Gene Expression Patterns*. 6: 127-133.
- Medina, F.A., C.J. de Almeida, E. Dew, J. Li, G. Bonuccelli, T.M. Williams, A.W. Cohen, R.G. Pestell, P.G. Frank, H.B. Tanowitz, and M.P. Lisanti. 2006. Caveolin-1-Deficient Mice Show Defects in Innate Immunity and Inflammatory Immune Response during *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection *Infect. Immun.* 74: 6665-6674.
- Montagnani, C., J.C. Avarre, J. de Lorgeril, M. Quiquand, V. Boulo, and J.M. Escoubas. 2007. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Developmental & Comparative Immunology*. 31: 1-11.
- Montagnani, C., C. Kappler, J.M. Reichhart, and J.M. Escoubas. 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-[kappa]B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters*. 561: 75-82.
- Montagnani, C., F. Le Roux, F. Berthe, and J.-M. Escoubas. 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Letters*. 500: 64-70.
- Nile, C.J., C.L. Townes, B.H. Hirst, and J. Hall. 2006. The novel avian protein, AWAK, contains multiple domains with homology to protease inhibitory modules. *Molecular Immunology*. 43: 388-394.
- Orino, K., L. Lehman, Y. Tsuji, H. Ayaki, S. Torti, and F. Torti. 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem. J.* 357: 241-247.
- Pipe, R.K., C. Porte, and D.R. Livingstone. 1993. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology*. 3: 221-233.
- Rodet, F., C. Lelong, M.-P. Dubos, K. Costil, and P. Favrel. 2005. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1730: 187-195.
- Samain, J.F., L. Dégremont, P. Soletchnik, J. Haure, E. Bédier, M. Ropert, J. Moal, A. Huvet, H. Bacca, A. Van Wormhoudt, M. Delaporte, K. Costil, S. Pouvreau, C. Lambert, V. Boulo, P. Soudant, J.L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, B. Gagnaire, F. Geret, I. Boutet, T. Burgeot, and P. Boudry. In Press. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes.

- Samanta, M.P., W. Tongprasit, S. Istrail, R.A. Cameron, Q. Tu, E.H. Davidson, and V. Stolc. 2006. The Transcriptome of the Sea Urchin Embryo. *Science*. 314: 960-962.
- Sampayo, J.N., A. Olsen, and G.J. Lithgow. 2003. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of superoxide dismutase/catalase mimetics. *Aging Cell*. 2: 319-326.
- Sato, K., N. Nishi, and M. Nomizu. 2004. Characterization of a fasciclin I-like protein with cell attachment activity from sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) ovaries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 424: 1-10.
- Shen, C., Y. Ye, S.E. Robertson, A.W. Lau, D.-O.D. Mak, and M.M. Chou. 2005. Calcium/Calmodulin Regulates Ubiquitination of the Ubiquitin-specific Protease TRE17/USP6. *J. Biol. Chem*. 280: 35967-35973.
- Silverman, G.A., P.I. Bird, R.W. Carrell, F.C. Church, P.B. Coughlin, P.G. Gettins, J.A. Irving, D.A. Lomas, C.J. Luke, R.W. Moyer, P.A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G.S. Salvesen, J. Travis, and J.C. Whisstock. 2001. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*. 276: 33293-33296.
- Silverman, N. and T. Maniatis. 2001. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*. 15: 2321-2342.
- Smallwood, H., L. Shi, and T. Squier. 2006. Increases in Calmodulin Abundance and Stabilization of Activated Inducible Nitric Oxide Synthase Mediate Bacterial Killing in RAW 264.7 Macrophages. *Biochemistry*. 45: 9717-9726.
- Tanguy, A., X. Guo, and S.E. Ford. 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene*. 338: 121-131.
- Tanguy, A., C. Mura, and D. Moraga. 2001. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquatic Toxicology*. 55: 35-47.
- Tirapé, A., C. Bacque, R. Brizard, F. Vandebulcke, and V. Boulo. 2007. Expression of immune-related genes in the Oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev Comp Immunol*. In Press.
- van Gent, D., P. Sharp, K. Morgan, and N. Kalsheker. 2003. Serpins: structure, function and molecular evolution. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35: 1536-1547.



- Walsh, D., J. Grantham, X. Zhu, J. Wei Lin, M. van Oosterum, R. Taylor, and M. Edwards. 1999. The role of heat shock proteins in mammalian differentiation and development. *Environ Med.* 43: 79-87.
- Williams, T. and M. Lisanti. 2004. The caveolin proteins. *Genome Biology.* 5: 214.
- Zhang, Y., L. Xie, Q. Meng, T. Jiang, R. Pu, L. Chen, and R. Zhang. 2003. A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 135: 565-573.
- Zhu, L., L. Song, Y. Chang, W. Xu, and L. Wu. 2006. Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Fish & Shellfish Immunology.* 20: 320-331.

## **CHAPITRE III**

**Caractérisation et étude de l'expression de *Cg-MyD88*, une protéine adaptatrice de la voie de signalisation IL-1 et Toll-like récepteur, avec un rôle potentiel dans l'immunité innée pendant l'ontogenèse chez l'huître, *Crassostrea gigas***

### Chapitre III

#### Caractérisation et étude de l'expression de *Cg-MyD88*, une protéine adaptatrice de la voie de signalisation IL-1 et Toll-like récepteur, avec un rôle potentiel dans l'immunité innée pendant l'ontogenèse chez l'huître, *Crassostrea gigas*

**Publication 4:** A novel gene, *Cg-MyD88* in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* with a potential role in immunity

Pour être soumis dans FEBS Letters

L'immunité innée, présente chez tous les organismes multicellulaires, est la première ligne de défense contre les agents pathogènes (Beutler, 2004). Les travaux sur l'immunité innée des vertébrés, des insectes et des plantes ont révélé une remarquable conservation des composants moléculaires des cascades de signalisation impliquées dans les défenses de l'hôte, plus particulièrement de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Medzhitov et Janeway, 1998, Hoffmann et Reichhart, 2002). L'infection conduit à l'induction de cette voie de signalisation dans la majorité des espèces dans lesquelles la famille des Toll-like récepteurs (TLRs) joue un rôle important dans la reconnaissance des composants des pathogènes (Medzhitov et Janeway, 1997; Hoffman et al., 1999) (**Figure 16**). Les TLRs appartiennent à la superfamille des protéines contenant un domaine TIR (Toll/Interleukin-1 (IL-1) récepteur) qui est divisée en deux principaux sous-groupes, les IL-1Rs (« Interleukin-1 receptor ») et les TLRs (« Toll-like receptor ») (Bowie et al., 2000 ; Liew et al., 2005). Le sous-groupe des IL-1Rs est constitué d'au moins 10 récepteurs dont la majorité des membres incluent les récepteurs de type I et II, le récepteur IL-18, et les récepteurs « orphan » ST2 et SIGIRR (« single-immunoglobulin IL-1 related receptor »). Le sous-groupe des TLRs comprend les TLR1 à TLR11, qui reconnaissent avec une spécificité remarquable les PAMPs « Pathogen-associated Molecular Patterns » de virus, bactéries, champignons et parasites. Tous les membres de cette superfamille sont constitués d'un domaine conservé TIR dans la région cytosolique qui active les principales cascades de signalisation et plus communément celles qui conduisent à l'activation de la transcription du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) et des kinases activées par un stress (Slack et al., 2000; Beutler, 2004). Ce domaine TIR des TLRs/ IL-1Rs interagit notamment avec le domaine TIR d'une protéine adaptatrice cytosolique, MyD88. Cette dernière contient 2 domaines, le domaine TIR dans la partie C-terminale qui est relié par une séquence intermédiaire au domaine « Death domain » (DD) dans la partie N-terminale. Ce

domaine DD se lie avec différentes protéines telles que les SIIK (« serine threonine innate immunity kinases ») qui incluent Pelle chez la *Drosophile* et IRAK chez les mammifères (Belvin et Anderson, 1996; Cao et al., 1996). Chez les mammifères, l'interaction de MyD88 avec IRAK1 conduisant à la phosphorylation de IRAK4 est essentielle pour le déclenchement de la cascade. L'inhibition de MyD88 provoque l'arrêt de la cascade de NF- $\kappa$ B (Liew et al., 2005). D'autres protéines adaptatrices (MAL, TRIF, TRAM) peuvent partiellement compenser ce blocage (Liew et al., 2005). Chez la souris un variant de MyD88, nommé MyD88s, qui code une protéine où la région intermédiaire est absente, a été identifié par Janssens et al. (2002). Compte tenu que MyD88s ne conduit pas à la phosphorylation de IRAK4, ces auteurs suggèrent que MyD88s est un inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B via l'induction de TLRs/IL-1 et ainsi il aurait un rôle comme régulateur négatif de cette cascade.

Chez l'huître *C. gigas*, deux membres de la voie NF- $\kappa$ B ont été caractérisés, *oIKK* «oyster I $\kappa$ B Kinase» (Escoubas et al., 1999) et *Cg-Rel* (Montagnani et al., 2004). De plus, par une approche EST, 4 éléments de cette voie ont été identifiés, parmi lesquels un ADNc incomplet de 322 bp présentant des homologies avec les MyD88 de vertébrés et d'invertébrés (Gueguen et al. 2003). Nous avons montré dans le chapitre I de cette thèse que ce gène, *Cg-MyD88*, a un pic d'expression dans les larves en métamorphose et que son expression est affectée après un challenge bactérien.

Après un séquençage complet de l'ADNc, les comparaisons de séquences et les analyses phylogénétiques ont révélé que *Cg-MyD88* était une protéine cytosolique adaptatrice de type MyD88 formant un cluster défini avec les MyD88 de mollusques et des autres invertébrés. *Cg-MyD88* montrait les caractéristiques structurales des domaines TIR, composé par trois boîtes conservées entre les différentes espèces. Les analyses quantitatives et qualitatives de l'expression de *Cg-MyD88* ont révélé que ce gène s'exprime de façon ubiquitaire dans les tissus de l'huître. Finalement, la cinétique d'expression de ce gène suite à un challenge bactérien sur des larves et du naissain a montré une augmentation de l'expression de ce gène jusqu'à 48h après le challenge. Cependant, chez le naissain une diminution de l'expression a tout d'abord été observée jusqu'à 9h après le challenge. Cette modulation de l'expression peut résulter d'une régulation transcriptionnelle couplée à une variation du nombre d'hémocytes. L'ensemble des résultats suggère que *Cg-MyD88* pourrait être impliqué dans la réponse immunitaire et dans le développement chez l'huître, cependant compte tenu que *Cg-MyD88* ne contient qu'un domaine TIR il pourrait avoir une fonction divergente des protéines MyD88 typiques, et notamment être impliqué dans la régulation de la voie NF- $\kappa$ B comme régulateur négatif.

## A novel gene, *Cg-MyD88* in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* with a potential role in immunity

Pour être soumis dans FEBS Letters

Tirapé A<sup>1</sup>, Montagnani C<sup>2</sup>, Lallemand P<sup>1</sup>, and V. Boulo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UMR5119, IFREMER, CNRS, UMII, Ecolag, Université de Montpellier II, 2 Place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>2</sup>Laboratoire Biotechnologie et Qualité de la Perle, Centre Océanologique du Pacifique (IFREMER), BP 7004, 98719 Taravao, Tahiti, Polynésie française.

---

### Abstract

The NF- $\kappa$ B signaling pathway involves myeloid differentiation factor 88 (MyD88) that acts as an important adapter protein in various species including vertebrates and invertebrates. Here, we report the molecular characterization of an original gene, *Cg-MyD88*, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Sequence and phylogenetic analyses showed that *Cg-MyD88* shares the structural organization and more particularly great homologies with TIR domain proteins of other species. In addition, amino acid sequence comparison of *Cg-MyD88* with MyD88 proteins from other species revealed that *Cg-MyD88* only contains one TIR domain whilst typical MyD88 proteins consist in an N-terminal death (DD) and a C-terminal Toll/Interleukin-1 receptor domain (TIR) separated by a variable linker sequence. The expression of *Cg-MyD88* seems to be ubiquitous although the transcript abundance is higher in hemocytes and mantle epithelium than in other tissues. *Cg-MyD88* expression kinetic appeared to be affected after a bacterial challenge. These results suggest that *Cg-MyD88* belongs to the MyD88 protein family and could be implicated in innate immune response. However, according to the particularity of *Cg-MyD88* organization, it could play a divergent role of typical MyD88 and more particularly be a negative regulator of a putative NF- $\kappa$ B signaling pathway in the oyster.

*Keywords:* Invertebrate; Bivalve Mollusk; Ontogeny; Development; Myeloid differentiation factor 88; TIR domain; Signaling pathway.

---

\* Corresponding author:

UMR5119, IFREMER, CNRS, UMII, Ecolag, Université de Montpellier II, 2 Place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Phone number: 33 (0)4 67 14 47 06

Fax number: 33 (0)4 67 14 46 22

Email address: [vboulo@ifremer.fr](mailto:vboulo@ifremer.fr)

## **1. Introduction**

The immune system in oysters relies entirely on innate immunity, like in other invertebrates lacking the adaptive immune system. The innate immune system is conserved between insects and mammals and is the first line of defense against infectious microorganisms [1,2]. During last decade, studies have been focalized on the molecules and mediators involved in the initiation of innate immune response, responding specifically to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [3-6]. Central to pathogen recognition is the TLR/MyD88 molecular complex that transmits signals from these PAMPs. This complex then relays a signal to the transcription factor NF- $\kappa$ B [7-9]. Activation of NF- $\kappa$ B leads to the expression of many genes notably implicated in the immune response and development [10,11].

MyD88 (Myeloid differentiation factor-88) is an essential adaptor protein used by the signal transduction pathway activated by the Toll-like receptor (TLR) and interleukin-1 receptor (IL-1R) family members [12,13]. MyD88 proteins are characterized by two domains, a N-terminal death domain (DD), associated to a C-terminal Toll/Interleukin-1 receptor domain (TIR) separated by a short linker sequence [14,15]. The TIR domain is an evolutionary ancient protein-protein interaction domain that occurs in diverse species, including vertebrates, invertebrates and plants [16-19]. In vertebrates, proteins bearing a TIR domain can be divided into three subgroups. The first one contains receptor proteins possessing a second domain which is an extracellular immunoglobulin (Ig) domain and includes the Type I IL-1 receptor (IL-1RI) and ST2 [20,21]. The second subgroup is also composed of receptor proteins, TLRs, which have additional extracellular leucine-rich repeats (LRR) [5]. Finally, the third subgroup consists of predicted cytosolic proteins that function as adaptor proteins connecting the Toll-like or interleukin receptors with the downstream signaling pathways [22]. These proteins have either a variable second domain, like in MyD88 and SARM (Sterile and heat-ARmadillo Motifs proteins, [23]), or this domain is lacking like in Mal (MyD88-Adaptor-Like or TIRAP; [24]), TRIF (TIR-domain containing adaptor inducing INF- $\beta$ , or TICAM-1; [25]) and in TLR4 adaptor TRAM (TRIF-Related Adaptor Molecule or TICAM-2) [26].

The MyD88 death domain associates to the death domain of IL-1R-associated kinase (IRAK). Subsequent autophosphorylation of IRAK enables its interaction with downstream adaptors, ultimately leading to the activation of a kinase cascade to the translocation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [27]. The DD domains mediate self-association between signal

proteins and are related to death signal transduction, notably implicated in the regulation of apoptosis and inflammatory responses [28].

In the oyster *C. gigas*, two components of the Rel/NF- $\kappa$ B pathway have been fully characterized, a gene encoding an IKK-like protein ( $\alpha$ IKK) which shares structural and functional properties with mammalian homologs [29] and a Rel/NF- $\kappa$ B transcription factor structurally and functionally related to the insect Rel proteins [30]. In addition, in an Expressed Sequence Tags (ESTs) program of identification immune-related genes in the hemocytes of *C. gigas*, four cDNA highly homologous to other components of the Rel/NF- $\kappa$ B pathway including the adapter proteins MyD88, ECSIT, TRAF, and I $\kappa$ B were identified [31]. This finding strongly suggested the presence of a Rel/NF- $\kappa$ B pathway in the Pacific oyster, *C. gigas*.

In this study, we report the complete coding sequence and characterization of *Cg-MyD88* (*Crassostrea gigas*-Myeloid Differentiation factor 88). Sequence analysis shows that *Cg-MyD88* has one homologous domain to the TIR domain of MyD88 from other species. Phylogenetic studies confirmed the structural analyses and showed that *Cg-MyD88* belongs to the MyD88 protein family. Our results led to the identification of a novel gene, *Cg-MyD88*, in the Pacific oyster and support its potential role in immune system.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Sequencing and phylogenetic analyses*

A partial coding sequence (322bp, BQ426631), homologous to MyD88 protein family members, was identified from a cDNA library constructed in  $\lambda$ ZAP Express vector (Stratagene) from hemocytes of bacteria challenged *C. gigas* oysters [31]. Complete sequencing of this clone was then performed. The nucleotide and predicted amino acid sequences were analyzed using BLAST and BLASTX programs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A list of all known MyD88 and TIR-containing sequences was obtained from the GenBank and EMBL databases using the BLAST program. Sequence alignments were performed using CLUSTAL W Version 1.81 [32]. The identification of putative protein motifs was performed using the MotifScan @ SIB (Swiss Institute of Bioinformatics; <http://hits.isb-sib.ch>) softwares. A similarity matrix of MyD88 and TIR-containing protein sequences was generated using the MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) software [33].

Phylogenetic tree was computed using the MEGA 3 program (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 3.0) [34]. The tree was built by the neighbour-joining method based on the alignment of the sequences using ClustalX. Bootstrap values (%) of 1000 replicates were calculated for each node of the consensus tree obtained.

## 2.2. Animals

D-hinged larvae, veliger larvae and spat of *C. gigas* were produced in the IFREMER hatchery (La Tremblade, France) according to the protocol described in Tirapé et al. [35]. Adult oysters were purchased from a commercial farm (Palavas, Gulf of Lion, France) and the tissues (100 mg), gills, hemocytes, mantle margin, mantle inner surface, adductor muscle, labial palps, digestive gland, and heart were collected from 3 oysters.

## 2.3. Experimental bacterial challenge

Three bacterial strains (*Vibrio tasmaniensis*, *V. anguillarum* and *Micrococcus luteus*) were grown separately overnight at 20-25°C in saline peptone water (SPW) for *Vibrio* strains, or at 30°C in Luria-Bertani medium (LB) for *M. luteus*. A mixture of these bacteria, which are non-pathogenic for *C. gigas*, were used to stimulate D-hinged larvae, veliger larvae and spat. Number of bacterial cells was estimated from the optical density at 550 nm (1 unit OD<sub>550</sub> corresponds to 5.10<sup>8</sup> bacteria/ml). For larval stages, the experimental bacterial challenges were carried out by immersing 200.000 larvae from 3 independent biparental fertilizations, in 2.5 L aquarium filled with filtered seawater at 20°C under air bubbling. The experimental stimulation was performed with a mixture containing the three strains concentrated at 3.10<sup>7</sup> live bacteria/L (10<sup>7</sup> of each bacteria strain in their respective overnight culture medium). Unchallenged larvae were used as control. Samples were collected 6, 9, 12, 24 and 48 h from challenged and unchallenged larvae for RNA extraction.

For spats (3 months old), 50 individuals per experimental condition were used. Experimental stimulation was carried out by immersing early juvenile oysters in 20L seawater tanks with the bacterial mixture described above (5.10<sup>8</sup> bacteria/L). In parallel, some spats were not stimulated to be used as controls. Samples were collected 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h from challenged and unchallenged spats and processed for RNA extraction.

## 2.4. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted using TRIzol<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After total RNA treatment with DNase I (2U, Invitrogen), a second



TRIZol extraction was achieved to inactivate DNase. The total RNA concentration was determined by OD<sub>260</sub> measurements and the RNA integrity was checked by electrophoresis. Two µg of total RNA extracted from each developmental stage were reverse transcribed using 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the supplier's instructions.

### 2. 5. *In situ* hybridization (ISH)

Spat and adults samples were fixed in a solution containing 35% formaldehyde, 40% ethanol and 2% ammonium hydroxide. After dehydration, animals were embedded in paraplast and serial 7 µm sections were cut, mounted on poly-L-lysine coated slides, and stored at 4°C until use. Digoxigenin (DIG)-UTP-labeled anti-sense and sense riboprobes from *Cg-MyD88*, were generated from linearized DNA plasmids by *in vitro* transcription using RNA labeling kits, T3 and T7 RNA polymerase (Roche). DIG-labeled riboprobes (40–100 ng/slide) were hybridized on tissue sections according to a previously developed protocol [36].

### 2.6. Real-time PCR assay

To compare *Cg-MyD88* gene expression between challenged and unchallenged larvae and spat, the relative abundance of *Cg-MyD88* was normalized to the amount of an endogenous reference, the gene encoding the elongation factor 1 gene (*Cg-EF1α*) [31].

The *Cg-MyD88* primers were designed using the primer 3 software ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), the forward *Cg-MyD88F* (5'-AGGTACCGGCTGTGATACGA-3') and reverse *Cg-MyD88R* (5'-TTCAAACGCCACCAAGACTG-3'). For *Cg-EF1α* the forward and reverse primers were EFF (5'-ATGCACCAAGGCTGCACAGAAAG-3') and EFR (5'-TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT-3'), respectively [30].

PCR amplifications were carried out with a LightCycler™ (Roche) in the presence of SYBR-Green™ (Master SYBR Green™) according to the protocol described by Tirapé et al. [35]. The relative expression of *Cg-MyD88*-like was calculated based on a comparative method [37,38]. The relative quantification value of sample, normalized to the *Cg-EF1α* gene (internal control) and relative to the unchallenged sample, is expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct = Ct (Cg-MyD88\text{-like}) - Ct (Cg-EF1\alpha)$  and  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{challenged sample}) - \Delta Ct (\text{unchallenged sample})$ .

For tissue expression of *Cg-MyD88*, the relative level was calculated for 100 copies of the housekeeping gene (*Cg-EF-1 $\alpha$* ) by using the following formula:

$$N = 100 \times 2^{(Ct_{Cg-EF-1\alpha} - Ct_{Cg-MyD88})} [39].$$

Data were analyzed using ANOVA and Student's t-test and differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . All results are represented as mean  $\pm$  standard error.

### 3. Results and discussions

#### 3.1. Molecular cloning and sequence analysis of a MyD88 family member, *Cg-MyD88* in *C. gigas*

The complete sequencing of the EST BQ426631, isolated from a hemocyte library [31] led to the identification of a 931 bp full-length cDNA called *Cg-MyD88* (DQ530619) (Fig. 1). The sequence possesses a 552 bp long open reading frame (ORF) starting with an ATG at position 42-44 and ending with a TAA at position 591-593. The A of the ATG codon which is designated +1, is located in a favorable sequence for translation, determined by the presence of a purine (preferably an A) at position -3 and a G in position +4 [40]. The deduced ORF is predicted to encode a 183 amino acid residue protein (ABF81403) that was highly identical (98.9%) to a full-length sequence identified in an EST library from *C. gigas* gonad tissue, called here *Cg-MyD88-2* (Marine Genomic Europe, ESTs Project <http://www.marine-genomics-europe.org>) and also predicted to encode a 183 amino acid protein (unpublished) (Fig. 2A). The two predicted proteins differ by 2 amino acid residues, of which only one corresponds to semi-conserved substitutions. These results suggest the existence of a polymorphism within oyster *Cg-MyD88* genes that may have resulted from the fact that these two sequences did not come from the same tissue and same oysters. Moreover, two incomplete *Cg-MyD88* sequences (ABC61701; ABC61702) identified from *C. gigas* bacterial artificial chromosome libraries presented some homologies (43.2%) with *Cg-MyD88* [41] (Fig. 2A).

In order to predict the structure of *Cg-MyD88*, the amino acid sequence was analyzed using the Profile Scan program. The *Cg-MyD88* amino acid sequence was found to possess a characteristic C-terminal TIR domain, but to devoid an N-terminal Death Domain (DD) and a linker sequence, as opposed to other MyD88 proteins which consist of two domains, an N-terminal death (DD) and a C-terminal Toll/Interleukin-1 receptor domain (TIR) separated by a variable linker sequence [14,15] (Fig. 2B).

Amino acid sequence analyses revealed strong homologies between *Cg-MyD88* and proteins containing a TIR domain (Fig. 2A). The overall sequence similarity of *Cg-MyD88* protein with MyD88 proteins of various species, apart from *Cg-MyD88-2*, ranged from 20.5 to 46.4% (Fig. 2A). Interestingly, *Cg-MyD88* protein showed the greatest similarity (46.4%) with whole sequence of MyD88 protein of *Strongylocentrotus purpuratus*, *Sp2-MyD88*, of which the complete sequence also only contains the C-terminal TIR domain. However, in this marine invertebrate, a typical MyD88 (*Sp1MyD88*) also was identified with both DD-intermediate-TIR domains. The respective role of each protein remains unclear [42].

When only TIR domains were compared, *Cg-MyD88* showed a high similarity/identity with the *Cg-MyD88-2* identified from the oyster gonad tissue (97.2%) followed by a strong similarity with vertebrate MyD88 proteins. More particularly, the highest similarities (48-48,6%) were found with vertebrate *Danio rerio* (NP\_997979) and *Homo sapiens* (Q99836) TIR domains. Among the invertebrate sequences, the highest homology was found with the bivalve mollusk *Chlamys farreri* TIR domain (43.5%) of a typical MyD88 (Song and Qiu, 2005 from GenBank).

In addition, the amino acid TIR sequence of *Cg-MyD88* did show important homologies with other cytosolic or receptor proteins containing a TIR domain (Fig. 2A). If sequence identities between *Cg-MyD88* and TIR domains from each protein subgroup, adaptors and receptors, reached a 23% limit (ranging from 10.2% identity to 23.5%), sequence similarities could be as high as between MyD88 proteins. In particular, strong homologies were observed between the TIR domains of human, drosophila or shrimp TLRs and *Cg-MyD88* (ranging from 42.4 % to 46.9% similarity). Such sequence conservation suggests similar chemical properties and potentially associated binding activities, thus a possible interaction between *Cg-MyD88* and a putative TLR in oyster could exist.

The TIR domains are characterized by three important regions Boxes 1, 2 and 3. The alignment between *Cg-MyD88* and TIR-containing proteins from other species showed conserved regions (Fig. 3). In *C. gigas*, the Box-1 is highly conserved ((F/Y)DAF), whereas Boxes 2 (LCV\*\*RD\*\*PG) and 3 (FWTRL) are partially conserved, since the sequence of the *Cg-MyD88* boxes 2 and 3 consisted of L(Y)V\*\*(T)D\*\*(EP) and (V)W(D)RL), respectively. The role of boxes 1 and 3 remains unclear but the box 2 is implicated in the formation of a loop structure that probably regulates some interactions between elements in signal transduction pathway [24]. Partial conservation of this box 2 in oyster could confer a divergent structure to *Cg-MyD88* protein.

Finally, phylogenetic analyses performed using the MyD88 sequences available on databases confirmed that *Cg-MyD88* is strongly related to other MyD88 mollusk (supported by a strong bootstrap value) and invertebrate proteins (Fig. 4). A clear branching was observed between vertebrate and invertebrate proteins. Phylogenetic trees performed exclusively with TIR domains sequences showed the same topology (data not shown).

Taken together these results strongly suggest that this new oyster protein, *Cg-MyD88* is a conserved adaptor protein of MyD88 protein family. MyD88 is implicated in the NF- $\kappa$ B pathway in various species [43,44], of which the primary physiological role is in the immune system [10].

### 3. 2. *Tissue localization of Cg-MyD88 transcripts*

To investigate tissue expression of *Cg-MyD88*, real time quantitative PCR analyses were carried out using total RNA from 8 tissues of adult oyster, namely gills, hemocytes, mantle margin, mantle inner surface, adductor muscle, labial palps, digestive gland and heart (Fig. 5A). The mRNA amounts of *Cg-MyD88* measured in all the tissues were not significantly different although the transcript abundance appeared higher in hemocytes, the oyster immune competent cells and mantle margin than in other tissues. This rather ubiquitous expression of *Cg-MyD88* pattern is consistent with results found for the *MyD88* transcripts in vertebrates [45,46].

In order to determine the cellular localization of *Cg-MyD88* transcripts in various tissues, the mRNAs were detected using *in situ* hybridization in adults and on various developmental stages (veliger larvae, pediveliger larvae and spat). Histological sections were probed with Dig-labeled antisense or sense riboprobes. No signal was observed in sections hybridized with *Cg-MyD88* sense riboprobes used like negative controls (Fig. 5B, 1b, 2b, 3b). In the larval stages, no labeling was detected, probably due to the lack of sensitivity of this technique and to a transcript abundance of *Cg-MyD88* below the threshold of detection in these stages. *Cg-MyD88* mRNAs were detected in both hemocytes circulating and attached to hemolymphatic vessel endothelium from adults (Fig 5B 1a) and spat (data not shown). *Cg-MyD88* mRNAs were particularly detected in the gills (Fig. 5B, 2a) and mantle margin epithelium, which constitute a first defense barrier against pathogen invasion in filtering animals (Fig. 5B, 3a). Signals were also observed in infiltrated hemocytes located in mantle connective tissue (Fig. 5B, 3a). These results confirmed the ubiquitous expression of *Cg-MyD88*. This expression of *Cg-MyD88* in tissues related to host defense, suggests a putative role of this gene in the

immune response. In healthy fish, *MyD88* gene is highly expressed in organs involved in immune function [46].

### 3. 3. Kinetics of *Cg-MyD88* expression after bacterial challenge

To investigate the effect of a bacterial challenge in the *Cg-MyD88* expression and the potential involvement of *Cg-MyD88* in the immune response, the relative gene expression kinetics was monitored in three development stages (D-hinged larvae, veliger larvae, and spat). *Cg-MyD88* relative transcript abundance was measured at various times after exposure (Fig 6), both in challenged and unchallenged samples. For the unchallenged samples, no significant difference of *Cg-MyD88* expression was observed at various times after bacterial exposure.

Following bacterial exposure, *Cg-MyD88* relative expression was significantly higher in challenged D-hinged and veliger larvae than in the control group, with 13.2 and 13.1 fold increase, respectively ( $p < 0.05$ ) at 24 h and 18.7 and 14.8 fold increase ( $p < 0.05$ ) at 48 h, respectively (Fig. 6 A and B). In spat, significant decrease in *Cg-MyD88* transcript level was observed at 9h after bacterial exposure (Fig. 6C) compared to the control group. Then, *Cg-MyD88* transcript levels increased progressively and significantly ( $p < 0.05$ ) at 24 and 48 h following bacterial exposure to recover the bottom level at 72 h. This decrease in the first hours after the exposure to the bacteria followed by the increase of the *Cg-MyD88* expression could be explained by a modulation of hemocyte number and a transcriptional regulation of this gene following a bacterial challenge. Indeed, the hemocyte proliferation seems to be involved in immune response in oyster after stimulation with bacteria [35] as in other invertebrates [36,47,48]. In fish, *MyD88* expression was up-regulated following stimulation with LPS and the proliferation of *MyD88* expressing cells in the infected tissue was clearly demonstrated [46]. This regulation suggests a participation of *Cg-MyD88* in immune response in oyster via its possible implication in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. These results were obtained from the whole spats. It will be interesting to compare the expression kinetic in adult where the expression can be followed in the various tissues and in circulating hemocytes, separately. In addition, future investigations will enable establishing whether this kinetic is in relation with the kinetics of some genes potentially involved in immune response and possibly regulated by NF- $\kappa$ B pathway like *Cg-Timp*, in which three  $\kappa$ B-motifs were identified in its promoter [49] and/or in genes encoding antimicrobial peptides known to contain the NF- $\kappa$ B motifs in their promoters [50,51].

#### 4. Concluding remarks

In oyster, the characterization of six genes related to the Rel/NF- $\kappa$ B pathway support the concept of a conserved signaling pathway [30], even if these components have not yet been proven to belong to the same cascade. Moreover, in other oyster, *C. virginica*, an EST homologous to Toll receptor 4 was identified [52]. The prominent role of MyD88 in host innate immunity and inflammation has been studied in various vertebrates and invertebrates species [43,46]. Our results indicate that *Cg-MyD88* may be a key component of the immune response since it could be involved in this conserved signal transduction pathway. However, due to the absence of the DD domain typically found in MyD88 proteins and involved in the interaction with IRAK in the NF- $\kappa$ B signaling pathway [53], and the partial conservation of the box 2 in the TIR domain of *Cg-MyD88*, this one could play a divergent role and more particular participate as a negative regulator downstream the NF- $\kappa$ B signaling pathway. In mouse, Janssens et al. [54] identified two sequences large and short called MyD88<sub>L</sub> and MyD88<sub>S</sub>. In the latter, the intermediate linker sequence was lacking and its expression was limited to the same tissues. These authors demonstrated that overexpression of MyD88<sub>S</sub> led to inhibition of IL-1- and LPS-induced but not TNF-induced NF- $\kappa$ B activation by formation of MyD88<sub>L</sub>-MyD88<sub>S</sub> heterodimers. Although MyD88<sub>S</sub> still bounds to IL-1R and IRAK4, it was defective in its ability to induce IRAK1 phosphorylation which is necessary for NF- $\kappa$ B cascade activation. In future work, we will investigate whether there is such a negative regulation mechanism in the oyster.

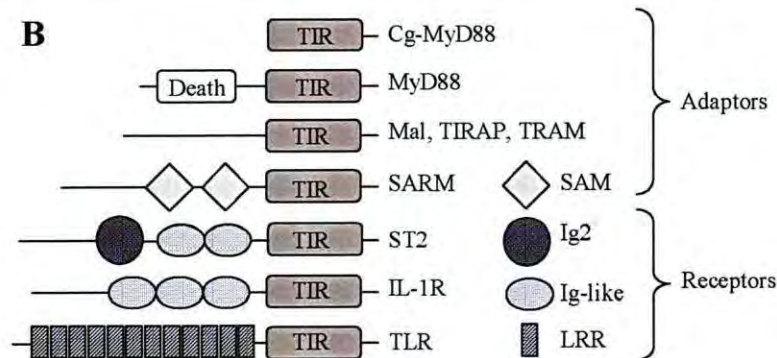
```

                -3 +1 +4
                ↓ ↓ ↓
1 gttttgaatgagtaacaaagcacaataatagtggttacgatgggtgcatatgactacgac
                                M G A Y D Y D 7
65 gcttttgtgatttacaacccccatggtcaggaccaggagtttgtcagtcttatgactcaa
    A F V I Y N P H G Q D Q E F V S L M T Q 27
125 gtgctgacctccccctcactacaacctcagactctacgtgccatggacggataacaacgaa
    V L T S P P Y N L R L Y V P W T D N N E 47
185 ccctttgaagctgtagccacggctgaaaatattgagaaaagatgcaaaaaagttctagtt
    P F E A V A T A E N I E K R C K K V L V 67
245 gttatatcagcggcatttttggaaagtgacctgtttcattttcaacttaaagttgcccat
    V I S A A F L E S D L F H F Q L K V A H 87
305 tccatgtcaccaggtgctcggagtagaaaaattattccaattcgattggattccacagag
    S M S P G A R S R K I I P I R L D S T E 107
365 gtaccggctgtgatacagatttacaacatcatgtgactattacaagaaagagctgagagtc
    V P A V I R F T T S C D Y Y K K E L R V 127
425 tttgtttgggacaggcttaattctgccttctgtaattgtgatgacaattataagtctaga
    F V W D R L N S A F C N C D D N Y K S R 147
485 atatcaaaagctgtgtcacttccggagaaaagagcgctcccggatttgattccaacttca
    I S K A V S L P E K R A L P D L I P T S 167
545 cccttaaaaagagttcagtccttgggtggcgtttgaaagcatccgttgcataaataattgttt
    P L K R V Q S W W R L K A S V A * 183
605 attctaactgcgattatataaatttgattttatgaaactattcttagaacagtgccatta
665 cgtatgtgaatgttgatcatttttttaattgaatactaatgattttatataatcaataca
725 ttataccagcacttcccttatattgtacacgcttttttgcaatgtttagaactttgtt
785 gctcaaatatattagctttaactaaattttatttcagatgcaatgtattacttccacaaa
845 ctttcaatgttatattttattatcagtgatgaataacataaaattttacaatctttggaa
905 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

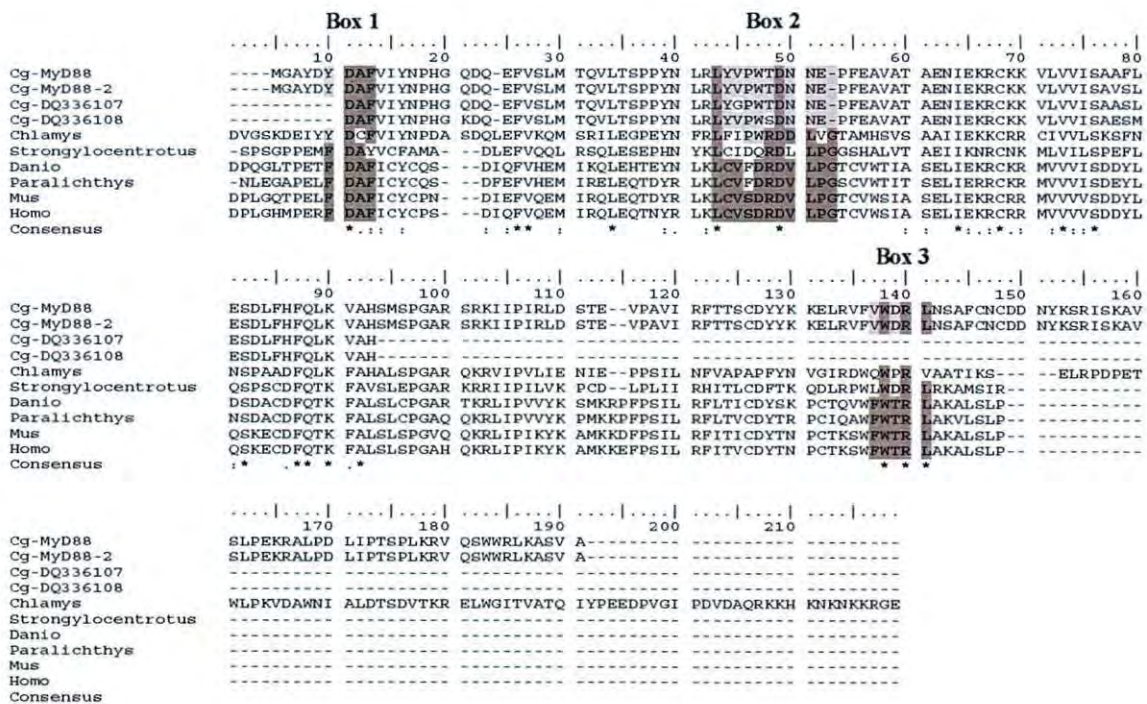
**Fig. 1.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Cg-MyD88*. The A of translation initiation codon is designated +1. Polyadenylation signal is underlined and in bold. Initiation and stop codons are in bold.

A	GenBank acc.	whole sequence		TIR domain	
		% Sim	% Id	% Sim	% Id
<b>Cytosolic proteins</b>					
	CgMyD88-2	98.9	98.9	97.2	97.2
	CgMyD88C1 ABC61701	43.2	43.2	44.6	44.6
	CgMyD88C2 ABC61702	43.2	41.5	44.6	42.9
	ChfMyD88 ABB76627	33.5	17.9	43.5	26.7
	DmMyD88 AAL56570	20.5	9.3	32.2	18.4
	Sp1MyD88 XP_780590	28.3	12.5	33.3	22.5
	Sp2MyD88 XP_001198763	46.4	25.9	32.8	21.9
	XlMyD88 AAH84238	33.9	13.8	45.2	27.6
	DrMyD88 NP_997979	32.4	14.8	48.0	32.6
	GgMyD88 ABJ98316	29.9	17.0	35.0	21.8
	HsMyD88 Q99836	30.7	17.0	48.6	30.4
	HsTIRAP AAH32474			27.7	14.1
	HsSARM Q6SZW1			27.7	10.2
	HsTICAM1 BAC55579			37.3	15.7
	HsTRAM AAO74498			39.5	13.2
<b>Receptor proteins</b>					
<b>IL-1R</b>					
	HsST2 Q01638			46.3	14.9
	HsIL1R1 P14778			37.3	14.6
<b>TLRs</b>					
	DmToll4 NP_523519			44.1	17.2
	DmToll5 AAF86227			42.4	20.0
	Dm18wheeler AAA79208			39.5	14.6
	LvTLR ABK58729			44.1	20.9
	HsTLR4 CAH72619			44.6	22.2
	HsTLR2 NP_003255			46.9	23.5
<b>TIR domains plants</b>					
	PtTIR-X AAM28910			39.0	14.7
	NRSA1 AAF61452			34.5	10.2

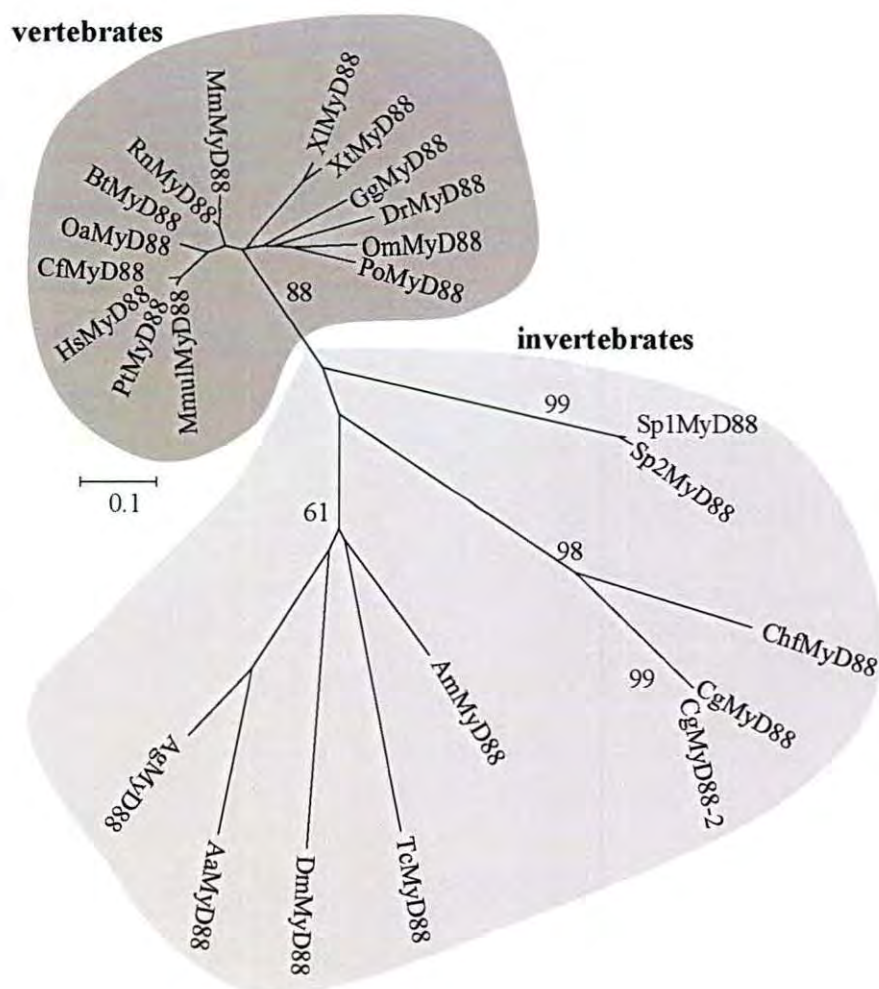


**Fig. 2:** Comparison of Cg-MyD88 and related protein sequences. **A.** Table of percentage amino acid similarity and identities between full length and TIR domains of MyD88 proteins (using MatGAT software). The % of similarity (Sim) and identity (Id) were computed using the MatGAT (Matrix Global Alignment Tool) software. **B.** Schematic representation of MyD88 proteins and TIR-containing proteins. Conserved domains determined using the SMART software are indicated. TIR=Toll/Interleukin-1 receptor, Mal=MyD88-Adaptor-Like, TRAM=TRIF-Related Adaptor Molecule, SARM=Sterile and heat-ARmadillo Motifs, IL-1R=interleukin-1 receptor, TLR=Toll-like receptor, Ig=immunoglobulin, LRR=leucine-rich repeats. **Cg:** *Crassostrea gigas*, **Chf:** *Chlamys farreri*, **Dm:** *Drosophila melanogaster*, **Dr:** *Danio rerio*, **Gg:** *Gallus gallus*, **Hs:** *Homo sapiens*, **Lv:** *Litopenaeus vannamei*; **Sp:** *Strongylocentrotus purpuratus*, **Xl:** *Xenopus laevis*, **Xt:** *Xenopus tropicalis*.



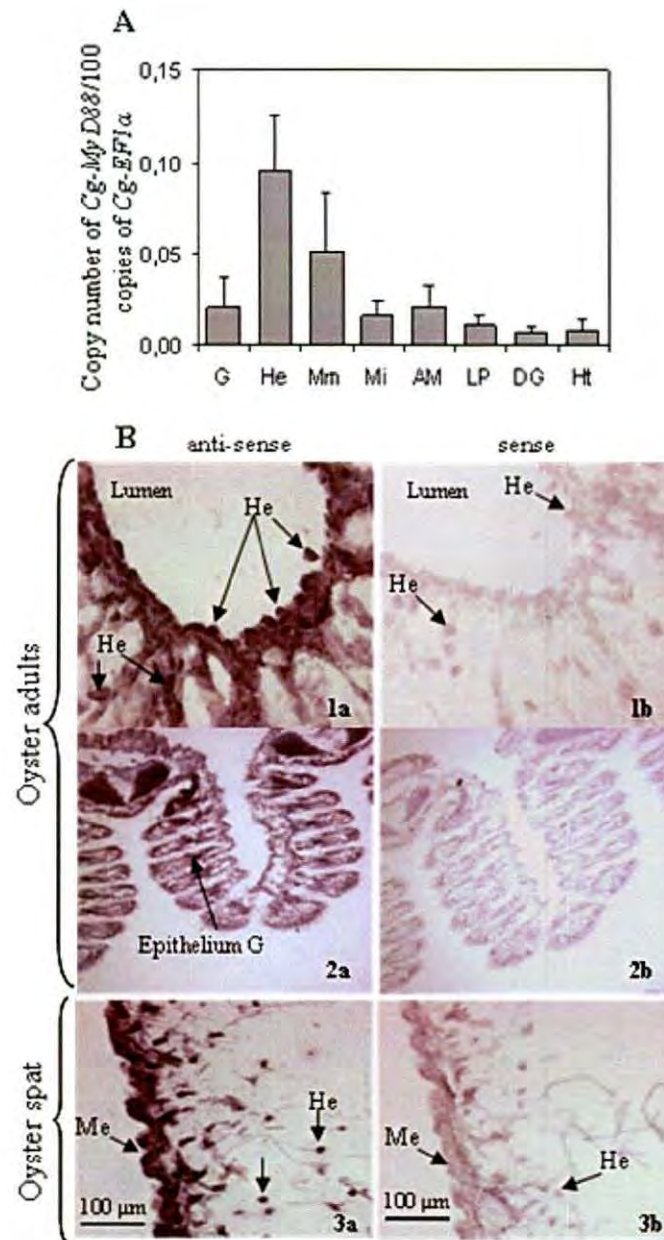


**Fig. 3:** Alignment of TIR domains of MyD88 proteins: Cg-MyD88 (MyD88 of *C. gigas*) and MyD88 of other species. Asterisks indicate identical residues in all sequences, double dots indicate conserved substitutions, and single dots indicate semi-conserved substitutions. The three important regions (Box 1, Box 2 and Box 3) in TIR domain are flamed. In Boxes, in clear gray background is the consensus between the Cg-MyD88 proteins and in black gray is the consensus between all sequences with CgMyD88.

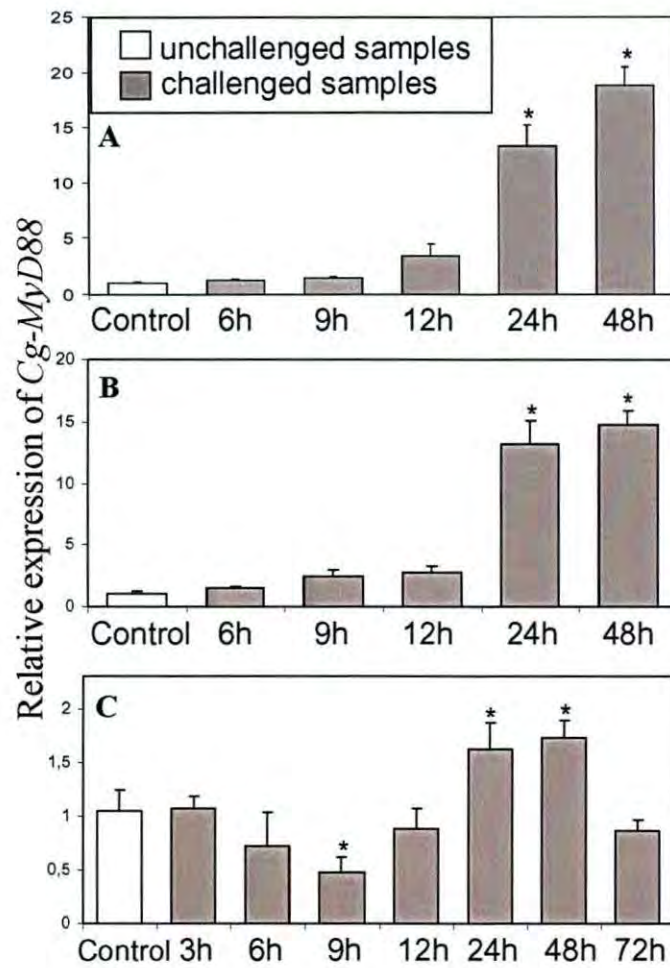


**Fig. 4:** Unrooted phylogenetic tree of MyD88 proteins. The tree was built by the neighbour-joining method based on the alignment of the sequences using ClustalX. Sequences for phylogenetic tree generation and amino acid sequence identity/similarity analyses were taken from Genbank and EMBL databases. The confidence scores of bootstrap values of 1000 replicates (%) are indicated for major branching nodes.

**Aa:** *Aedes aegypti*, **Ag:** *Anopheles gambiae*, **Am:** *Apis mellifera*, **Bt:** *Bos Taurus*, **Cf:** *Canis familiaris*, **Cg:** *Crassostrea gigas*, **Chf:** *Chlamys farreri*, **Dm:** *Drosophila melanogaster*, **Dr:** *Danio rerio*, **Gg:** *Gallus gallus*, **Hs:** *Homo sapiens*, **Lv:** *Litopenaeus vannamei*, **Mm:** *Mus musculus*, **Mmul:** *Macaca mulatto*. **Oa:** *Ovis aries*, **Om:** *Oncorhynchus mykiss*, **Po:** *Paralichthys olivaceus*, **Pt:** *Pan troglodytes*, **Rn:** *Rattus norvegicus*, **Sp:** *Strongylocentrotus purpuratus*, **Tc:** *Tribolium castaneum*, **Xl:** *Xenopus laevis*, **Xt:** *Xenopus tropicalis*.



**Fig. 5:** Tissue expression of *Cg-MyD88*. **A.** Relative expression of *Cg-MyD88* mRNA in adult tissues by quantitative real time PCR. Total RNAs were extracted from several tissues: gill (G), hemocytes (He), mantle margin (Mm), mantle inner surface (Mi), adductor muscle (AM), labial palps (LP), digestive gland (DG) and heart (Ht). Each value is the mean  $\pm$  standard error of three animal tissues. Expression levels are related to 100 copies of *Cg-EF1 $\alpha$* . **B.** Detection by *in situ* hybridization of *Cg-MyD88* mRNA in adult oysters and spat. Paraffin-embedded sections of adult oysters (1a, 2a) and spat (3a) were hybridized with antisense probes, arrows indicate hybridization signal in hemocytes (He) and gill (G) and mantle epithelium (Me). Control consisted of sections hybridized with sense probes, no labeling was observed (1b, 2b and 3b), arrows indicate unlabelled hemocytes. 1a-1b: hemolymphatic vessel, 2a-2b: gills, 3a-3b: mantle margin (Mm).



**Fig. 6:** Kinetic of relative expression of *Cg-MyD88* in D-hinged larvae (A), veliger larvae (B) and spat (C) of *Crassostrea gigas* by quantitative real time PCR according to Livack and Schmittgen (2001) method, after a bacterial challenge. Each value is the mean  $\pm$  standard error of larvae pools from the 3 independent biparental fertilizations or 3 individuals for spat. \* Significant difference with not challenged samples ( $p < 0.05$ ).

**References**

- [1] Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313-1318.
- [2] Kim T, Kim Y-J. Overview of Innate Immunity in *Drosophila*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2005;38 (2):121-127.
- [3] Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology* 2002;14 (3):380-383.
- [4] Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002;20 (1):197-216.
- [5] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* 2003;21 (1):335-376.
- [6] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*. 2004;6 (15):1382-1387.
- [7] Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling. *Science* 1997;278 (5343):1612-1615.
- [8] Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003;16 (4):637-646.
- [9] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2004;4 (7):499-511.
- [10] Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene* 2006;25 (51):6758-6780.
- [11] Prothmann C, Armstrong NJ, Rupp RAW. The Toll/IL-1 receptor binding protein MyD88 is required for *Xenopus* axis formation. *Mechanisms of Development* 2000;97 (1-2):85-92.
- [12] Edelson BT, Unanue ER. MyD88-Dependent but Toll-Like Receptor 2-Independent Innate Immunity to *Listeria*: No Role for Either in Macrophage Listericidal Activity. *J Immunol* 2002;169 (7):3869-3875.
- [13] Seki E, Tsutsui H, Tsuji NM, Hayashi N, Adachi K, Nakano H, Futatsugi-Yumikura S, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Fujimoto J, Nakanishi K. Critical Roles of Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Proinflammatory Cytokine Release in Early Phase Clearance of *Listeria monocytogenes* in Mice. *J Immunol* 2002;169 (7):3863-3868.

- [14] Hofmann K, Tschopp J. The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Letters* 1995;371 (3):321-323.
- [15] Mitcham JL, Parnet P, Bonnert TP, Garka KE, Gerhart MJ, Slack JL, Gayle MA, Dower SK, Sims JE. T1/ST2 Signaling Establishes It as a Member of an Expanding Interleukin-1 Receptor Family. *J. Biol. Chem.* 1996;271 (10):5777-5783.
- [16] Cannon SB, Zhu H, Baumgarten AM, Spangler R, May G, Cook DR. Diversity, Distribution, and Ancient Taxonomic Relationships Within the TIR and Non-TIR NBS-LRR Resistance Gene Subfamilies. *Journal of Molecular Evolution* 2002;54 (4):548-562.
- [17] Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X. Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. *Adv Exp Med Biol* 2005;560:29-39.
- [18] Allen-Vercoe E, Toh MCW, Waddell B, Ho H, DeVinney R. A carboxy-terminal domain of Tir from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC O157:H7) required for efficient type III secretion. *FEMS Microbiology Letters* 2005;243 (2):355-364.
- [19] Jebanathirajah JA, Peri S, Pandey A. Toll and interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing proteins in plants: a genomic perspective. *Trends in Plant Science* 2002;7 (9):388-391.
- [20] Tominaga S-i. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/C-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Letters* 1989;258 (2):301-304.
- [21] Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill L. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature* 2005;5 (6):446-458.
- [22] Bowie A, O'Neill L. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000;67 (4):508-514.
- [23] Kaiser WJ, Offermann MK. Apoptosis Induced by the Toll-Like Receptor Adaptor TRIF Is Dependent on Its Receptor Interacting Protein Homotypic Interaction Motif. *J. Immunol* 2005;174 (8):4942-4952.
- [24] Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA,

- O'Neill LAJ. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413 (6851):78-83.
- [25] Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- $\beta$  Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling. *J Immunol* 2002;169 (12):6668-6672.
- [26] Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. LPS-TLR4 Signaling to IRF-3/7 and NF- $\kappa$ B Involves the Toll Adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* 2003;198 (7):1043-1055.
- [27] Barton GM, Medzhitov R. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Science* 2003;300 (5625):1524-1525.
- [28] Weber CH, Vincenz C. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends in Biochemical Sciences* 2001;26 (8):475-481.
- [29] Escoubas J-M, Briant L, Montagnani C, Hez S, Devaux C, Roch P. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Letters* 1999;453 (3):293-298.
- [30] Montagnani C, Kappler C, Reichhart JM, Escoubas JM. Cg-Rel, the first Rel/NF- $\kappa$ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters* 2004;561 (1-3):75-82.
- [31] Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguere C, Girardot A-L, Garnier J, Hoareau A, Bachere E, Escoubas JM. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 2003;303:139-145.
- [32] Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences* 1998;23 (10):403-405.
- [33] Campanella J, Bitincka L, Smalley J. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 2003;4 (29):1-4.
- [34] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence. *Alignment Briefings in Bioinformatics* 2004;5:150-163.
- [35] Tirapé A, Bacque C, Brizard R, Vandenbulcke F, Boulo V. Expression of immune-related genes in the Oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev Comp Immunol* 2007; In Press.

- [36] Munoz M, Vandenbulcke F, Saulnier D, Bachère E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimps. *Eur. J. Biochem.* 2002;269:2678-2689.
- [37] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 2001;29:2003-2007.
- [38] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods* 2001;25 (4):402-408.
- [39] Rodet F, Lelong C, Dubos M-P, Costil K, Favrel P. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 2005;1730 (3):187-195.
- [40] Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 1991;266 (30):19867-19870.
- [41] Cunningham C, Hikima J, Jenny MJ, Chapman RW, Fang G, Saski C, Lundqvist ML, Wing RA, Cupit PM, Gross PS, Warr GW, Tomkins JP. New Resources for Marine Genomics: Bacterial Artificial Chromosome Libraries for the Eastern and Pacific Oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*). *Marine Biotechnology* 2006;8 (5):521-533.
- [42] Rast JP, Smith LC, Loza-Coll M, Hibino T, Litman GW. Genomic Insights into the Immune System of the Sea Urchin. *Science* 2006;314 (5801):952-956.
- [43] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA. MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Molecular Cell* 1998;2 (2):253-258.
- [44] Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: An evolutionary perspective. *Nature Immunology* 2002;3 (2):121-126.
- [45] Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa JR, Sims JE. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Letters* 1997;402 (1):81-84.
- [46] Takano T, Kondo H, Hirono I, Saito-Taki T, Endo M, Aoki T. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Developmental & Comparative Immunology* 2006;30 (9):807-816.
- [47] Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U. Thicker Than Blood: Conserved Mechanisms in *Drosophila* and Vertebrate Hematopoiesis. *Developmental Cell* 2003;5 (5):673-690.



- [48] Bachere E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 2004;198:149-168.
- [49] Montagnani C, Avarre JC, de Lorgeril J, Quiquand M, Boulo V, Escoubas JM. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Developmental & Comparative Immunology* 2007;31 (1):1-11.
- [50] Kadalayil L, Petersen U, Engstrom Y. Adjacent GATA and kappa B-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene. *Nucleic Acids Res.* 1997;25 (6):1233-1239.
- [51] Senger K, Armstrong GW, Rowell WJ, Kwan JM, Markstein M, Levine M. Immunity Regulatory DNAs Share Common Organizational Features in *Drosophila*. *Molecular Cell* 2004;13 (1):19-32.
- [52] Tanguy A, Guo X, Ford SE. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 2004;338 (1):121-131.
- [53] Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity* 1997;7 (6):837-847.
- [54] Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of Interleukin-1- and Lipopolysaccharide-Induced NF-[kappa]B Activation by Alternative Splicing of MyD88. *Current Biology* 2002;12 (6):467-471.

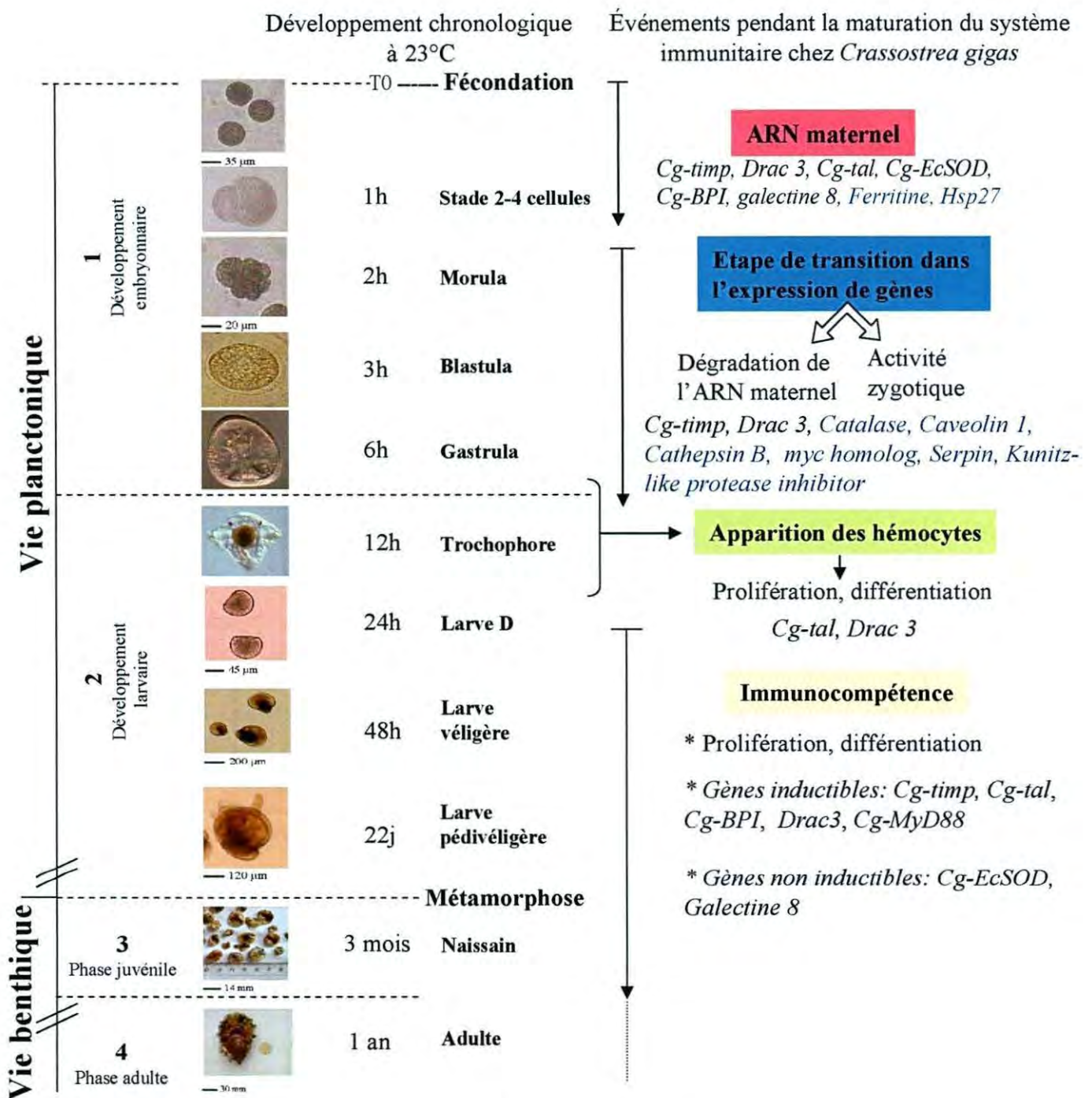
## **CONCLUSIONS – PERSPECTIVES**

## **Conclusions - Perspectives**

L'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse représente une contribution à l'étude de l'ontogenèse du système immunitaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Ces travaux ont été initiés sur la base des recherches et des résultats précédemment obtenus sur l'huître adulte. En effet, d'énormes avancées ont été réalisées chez l'huître adulte par la caractérisation de gènes immunitaires identifiés par des approches globales de génomique fonctionnelle, comme le « mRNA-Differential Display » (Escoubas et al., 1999; Montagnani et al., 2001; Barreau-Roumiguier et al., 2003), la réalisation de programmes d'ESTs (Gueguen et al., 2003) et de banques soustractives d'ADNc (Boutet et al., 2004; Huvet et al., 2004; Tanguy et al., 2004). Les hémocytes étant les cellules immunocompétentes chez l'huître, nous nous sommes intéressés à leur apparition au cours du développement et à leur activité transcriptionnelle d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Pour cela, des gènes spécifiquement exprimés dans les hémocytes et/ou potentiellement impliqués dans l'immunité chez l'huître adulte ont été sélectionnés pour étudier leur niveau d'expression et la localisation de leur expression au cours du développement. Le niveau d'expression de ces gènes a également été analysé suite à des expositions des différents stades de développement de l'huître à des bactéries. Par ailleurs, des nouveaux gènes différentiellement exprimés au cours du développement ont été recherchés par la construction de banques soustractives d'ADNc à partir des stades de développement sélectionnés sur la base des résultats d'expression des gènes précédemment étudiés. Enfin, nous avons caractérisé le gène, *Cg-MyD88* chez *C. gigas*, qui chez d'autres espèces est un composant de la cascade NF- $\kappa$ B.

### **Mise en place du système immunitaire au cours du développement.**

Le développement précoce d'un embryon est caractérisé par une première période de divisions cellulaires et une deuxième période de mise en place des trois feuilletts embryonnaires fondamentaux (ectoderme, mésoderme et endoderme), appelée gastrulation. La première étape de divisions se déroule conformément à un programme génétique pré-établi au cours de l'ovogenèse. Il s'accumule en effet dans l'ovocyte une réserve de molécules (protéines et ARN messagers maternels) qui interviendront au cours des premières divisions du développement (Davidson, 1986). L'analyse de l'expression de 8 gènes, potentiellement impliqués dans l'immunité chez l'huître adulte ou chez d'autres espèces, *Cg-timp*; *Drac 3*; *Cg-tal*; *Cg-EcSOD*; *Cg-BPI* (préalablement nommé *Cg-LBP/BPI*); *galectine 8*; *ferritine* et *Hsp27*, a montré que l'activité transcriptionnelle détectée dans les ovocytes et les embryons à



**Figure 26.** Principaux événements pendant l'ontogenèse et la maturation du système immunitaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Le développement chronologique des stades embryonnaires et larvaires est représentatif d'huîtres issues de fécondation artificielle et élevées en éclosérie à 23 °C, tandis que les naissains et les adultes sont représentatifs d'huîtres élevées en nurserie et en claire ostréicole. Les données représentent un bilan des étapes dans lesquelles le système immunitaire de l'huître se met en place, en groupant les gènes susceptibles d'intervenir à chacune d'elles. Les gènes précédemment étudiés chez l'adulte sont inscrits en noir et les gènes issus des banques soustractives sont inscrits en bleu.

2-4 cellules est d'origine maternelle (**Fig. 26**). Ces gènes peuvent conférer à ces premiers stades de développement une protection contre les infections. Cependant, la durée de vie limitée de ces ARNm maternels après la fécondation impose leur remplacement total par la mise en activité des gènes de l'embryon. Ce remplacement constitue le passage d'un contrôle maternel à un contrôle zygotique. La dégradation complète des ARN maternels est variable selon les espèces (Bashirullah et al., 2001), chez l'huître, cette dégradation se produit probablement à partir du stade morula (**Fig. 26**). Compte tenu que, les mécanismes qui régulent cette dégradation de l'ARN maternel sont relativement bien conservés au cours de l'évolution des métazoaires, il peut être supposé que la dégradation de l'ARN maternel chez l'huître est régulée d'une manière similaire (Bashirullah et al., 2001).

Afin d'étudier la mise en place du système immunitaire au cours du développement, nous avons tout d'abord recherché à quels stades de développement apparaissaient les hémocytes. Pour cela, nous avons entrepris la quantification et la localisation de l'expression de quatre gènes, *Cg-timp* et *Cg-EcSOD*, codant un inhibiteur de métalloprotéase et une superoxyde dismutase, respectivement (Montagnani et al., 2001; Gonzalez et al., 2005), et *Cg-tal* et *Drac3*, codant un facteur de transcription et une petite GTPase, respectivement. Ces gènes sont considérés comme des marqueurs des hémocytes (Barreau-Roumiguiere et al., 2003). Selon les résultats de quantification de l'expression de ces gènes, les hémocytes semblent présents dès 10-12 h après la fécondation, soit aux stades de gastrula-larve trochophore (**Fig. 26**). Des observations microscopiques et ultramicroscopiques de larves véligères ont montré effectivement la présence de cellules phagocytaires (hémocytes) dans la cavité viscérale (Elston, 1980).

La non détection de l'expression de ces gènes dans les stades larvaires n'a pas permis de déterminer la localisation des hémocytes et de leurs cellules précurseurs. Cette absence de marquage en hybridation *in situ* pourrait être dû au manque de sensibilité de cette technique compte tenu que la détection est dépendante de l'abondance des transcrits par cellules, qui peut être dans les jeunes stades relativement faible. Cependant, l'expression des gènes *Cg-tal* et *Cg-EcSOD* a été localisée dans le naissain. L'expression de *Cg-EcSOD* a été détectée dans les hémocytes circulants et infiltrants les tissus. Ces résultats sont en accord avec les observations rapportées par Gonzalez et al., (2005), démontrant que ce gène est exprimé spécifiquement dans les hémocytes. Des cellules exprimant le gène *Cg-tal* ont été observées attachées à l'endothélium des vaisseaux sanguins, mais aucun marquage n'a été observé dans des cellules du tissu conjonctif, suggérant que les cellules hématopoïétiques pourraient être issues des cellules endothéliales. Chez d'autres espèces comme la souris, le poulet et

l'homme, des travaux ont montré que les cellules endothéliales de l'aorte peuvent donner des cellules hématopoïétiques (de Bruijn et al., 2002 ; Oberlin et al., 2002; Jaffredo et al., 2005). Ainsi, chez l'huître les hémocytes pourraient être dérivés des cellules endothéliales des vaisseaux et non d'une différenciation des cellules du tissu conjonctif comme il est admis jusqu'à ce jour, bien que non démontré (Cheng, 1981).

Une augmentation progressive de l'activité transcriptionnelle des gènes *Cg-BPI*, *Cg-timp*, *Cg-MyD88*, *galectine8* et *Cg-EcSOD*, a été montrée au cours du développement, notamment à partir des stades trochophore et larve D. Stades à partir desquels apparaissent les hémocytes mais aussi des épithélia, notamment du manteau et du velum qui constituent une première barrière de défense contre les invasions de microorganismes. L'acquisition par les larves de cette capacité à produire ces effecteurs liés à l'immunité leur confère très probablement une immunocompétente accrue.

Des expériences de stimulation bactérienne à partir du stade gastrula ont été réalisées afin d'appréhender, au cours du développement, l'implication potentielle de ces effecteurs. Lorsque nous avons commencé nos travaux peu de données étaient disponibles sur les conditions de stimulation bactérienne des différents stades de développement. Nous avons donc entrepris, sur la base de ce qui était connu chez l'adulte et les quelques données sur des infections expérimentales de larves (Lacoste et al., 2001; Gay et al., 2004; Estes et al., 2004), d'exposer les embryons, les larves et le naissain à un mélange de bactéries non pathogènes par balnéation. La quantification de l'expression des effecteurs (*Cg-BPI*, *Cg-timp*, *Drac3* et *Cg-MyD88*, *Cg-tal*, *Cg-EcSOD* et *galectine 8*) dans les diverses conditions testées, a montré que l'activation de la transcription des gènes étudiés est dépendante du stade larvaire, du temps post-stimulation et des caractéristiques du stress, tels que bactéries vivantes ou tuées, milieu de culture stérile, ainsi que la quantité de bactéries. L'augmentation de l'expression de *Cg-tal* après une stimulation suggère que l'hématopoïèse était activée et contribuait à l'augmentation du nombre d'hémocytes. Cette augmentation de transcrits de *Cg-tal* était concomitante à celle de *Drac3*. Puisque, *Drac3* est essentiel pour la différenciation des hémocytes chez *Drosophila* (Sasamura et al., 1997), ces résultats suggèrent que la stimulation pourrait activer la différenciation des hémocytes après la prolifération. De plus, les hémocytes étant les cellules immunocompétentes, un site de production des effecteurs impliqués dans l'immunité, leur prolifération pourrait contribuer à renforcer la réponse de l'hôte aux stress. La prolifération des cellules impliquées dans l'immunité s'est révélée un élément important de la réponse immunitaire chez d'autres invertébrés (Sequeira et al., 1996; Muñoz et al., 2002; Soderhall et al., 2003).

Une augmentation du nombre de transcrits du gène *Cg-BPI* a été observée dans les stades larvaires et le naissain après une stimulation avec des bactéries. Comme chez l'adulte (Gonzalez, 2005), *Cg-BPI* pourrait ainsi jouer un rôle dans la réponse immunitaire au cours du développement. Cette augmentation du nombre de transcrits peut résulter d'une prolifération d'hémocytes comme également montré par les augmentations de l'expression des gènes *Cg-tal* et *Drac3*. Chez l'adulte, ce gène est exprimé de façon constitutive dans les épithélia mais est induit dans les hémocytes suite à une stimulation par les bactéries, démontrant son implication dans une première ligne de défense ainsi que dans la réponse aiguë. Dans les stades larvaires ainsi que dans le naissain soumis à une exposition avec des bactéries, *Cg-timp* pourrait intervenir comme chez l'adulte dans la réparation des blessures provoquées par la pénétration des microorganismes ou/et participer à des processus immunitaires comme l'échappement aux protéases de pathogènes (Montagnani et al., 2001). Deux transcrits de *Cg-Timp* ont été identifiés chez l'huître adulte. Une expression différentielle de ces deux transcrits a été démontrée au cours du développement, suggérant que ces deux transcrits pourraient avoir un rôle divergent. Nous avons observé que le niveau de transcription de *Cg-MyD88* augmente fortement après une exposition avec des bactéries dans tous les stades larvaires ainsi que dans le naissain. Nos résultats indiquent que *Cg-MyD88* peut être une composante clé de la réponse immunitaire par analogie à son rôle dans la voie de transduction du signal Rel/NF- $\kappa$ B chez diverses espèces de vertébrés et d'invertébrés (Wesche et al., 1997; Medzhitov et al., 1998). L'expression de deux gènes, *Cg-EcSOD* et *galectine 8* n'a pas été affectée par les expositions aux bactéries. Chez d'autres espèces et plus particulièrement chez l'huître adulte, ces gènes semblent cependant impliqués dans la réponse immunitaire (Gueguen et al., 2003; Gonzalez et al., 2005). Ces gènes peuvent être régulés en réponse à d'autres bactéries (bactéries pathogènes) ou à d'autres microorganismes, être régulés à un autre niveau que celui de la transcription (régulation post transcriptionnelle) ou être des gènes immunitaires non inductibles.

Ces travaux nous ont conduit à mettre en évidence que le système immunitaire, dans les jeunes stades de l'huître *C. gigas*, est relativement rudimentaire et immature, et se met en place progressivement. Les profils d'expression des gènes étudiés fait entrevoir des différences de réactivité des stades de développement aux stress, ce qui pourrait expliquer les différences de susceptibilité aux infections de ces stades. Lors de ces travaux, les larves pédivéligères, stade qui précède la métamorphose pendant laquelle d'importants remaniements d'organogenèse ont lieu, se sont révélées moins réactives aux stress puisque parmi les gènes étudiés seulement l'expression du gène *Drac3* est induite. Cependant, il sera

intéressant d'étudier de façon plus globale le transcriptome des stades clés du développement afin de mettre en évidence un réseau de gènes potentiellement impliqués dans l'état physiologique et ainsi définir avec plus de précision cette susceptibilité différentielle des stades de production de l'huître.

### **Recherche de gènes différentiellement exprimés dans des stades de développement de l'huître.**

Pour identifier des gènes nouveaux ou plus spécifiquement exprimés au cours du développement, le choix des stades de développement a été une phase essentielle basée sur l'acquisition de l'immunocompétence des stades déduite des résultats du chapitre précédent. La recherche des gènes différentiellement exprimés d'une part entre les stades précoces (morula, blastula et gastrula) et le stade larve D et d'autre part entre le stade larve D et le naissain, a été entreprise par la construction de banques soustractives. La technique d'hybridation soustractive SSH est une technique de choix pour sa capacité à discriminer des gènes différentiellement exprimés entre 2 stades ou conditions physiologiques selon des travaux déjà réalisés avec succès chez l'huître (Huvet et al., 2004; Tanguy et al., 2004, Boutet et al., 2004).

La comparaison des 668 ESTs aux bases de données publiques et l'utilisation de "Gene Ontology" (GO) a conduit à leur répartition en 6 catégories fonctionnelles distinctes selon la fonction putative des molécules dans d'autres organismes. GO est largement utilisé pour l'annotation fonctionnelle des gènes ainsi que leur classification (Ashburner et al., 2000), en se basant notamment sur les fonctions moléculaires, les processus biologiques et la communication cellulaire. Parmi les catégories fonctionnelles, la catégorie métabolisme a été la plus représentée dans les 4 banques, ces résultats sont en accord avec une forte activité métabolique requise pour le bon déroulement du développement (Samanta et al., 2006; Dumollard et al., 2007). Le haut pourcentage (64%) de séquences nouvelles trouvées dans les 4 banques suggère l'existence de nouveaux gènes spécifiques de mollusques, lesquels peuvent être potentiellement impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques tels que le développement ou l'immunité. Ce nombre important d'ESTs non annotés est souvent trouvé dans les études présentant des données d'ESTs chez les mollusques (Huvet et al., 2004; Boutet et al., 2004; Tanguy et al., 2004 et 2005).

Les ESTs annotés dans cette étude présentent une diversité caractérisée par l'identification de plusieurs gènes uniques impliqués dans diverses fonctions physiologiques et différentiellement exprimés au cours du développement. Sur la base des données



bibliographiques, nous avons sélectionné 13 gènes liés à l'immunité selon leur fonction chez d'autres espèces. Les profils d'expression de ces gènes mettent en évidence que dans les stades précoces (morula, blastula et gastrula) peu de gènes sont différentiellement exprimés, confirmant l'étude réalisée dans le premier chapitre de ce travail. Ainsi, ceci pourrait être expliqué par le silence transcriptionnel ou la faible activité transcriptionnelle des gènes dans ces stades de développement. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de la plus part des gènes a lieu à partir des stades larvaires, plus particulièrement aux stades larve D et larve véligère, stades à partir desquels un nombre plus important de gènes différentiellement exprimés a été trouvés. L'expression de ces gènes dans les stades de développement montre la mise en place de diverses voies susceptibles d'intervenir dans la défense mais également suggère l'existence d'une plus grande vulnérabilité de certains stades de développement.

Le rôle effectif de ces gènes potentiellement impliqués dans la réponse aux stress reste cependant à établir dans les différents stades de développement. Leur profil d'expression au cours du développement devra être étudié en réponse à des stress biotiques et abiotiques, tels que des expositions à des bactéries ou des virus, des polluants ou autres facteurs liés à l'environnement. L'exploitation des gènes non annotés pourrait conduire à l'identification de gènes spécifiques de l'huître et plus particulièrement exprimés au cours du développement. L'analyse de l'expression de l'ensemble de ces gènes dans diverses conditions pourra conduire à une meilleure définition de l'état physiologique des différents stades de développement et à établir une liste de marqueurs associés à un état physiologique optimal.

#### ***Cg-MyD88*, un composant potentiel de la cascade de régulation NF- $\kappa$ B.**

De remarquables similitudes ont été observées sur des voies de signalisation cellulaire impliquées dans la régulation de gènes immunitaires, plus particulièrement dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Medzhitov et Janeway, 1998). La découverte de cette voie, fortement conservée chez les organismes aussi éloignés phylogénétiquement que la drosophile et les mammifères, a permis de faire l'hypothèse d'une voie conservée au cours de l'évolution (Hoffmann et al., 1999; Hoffmann et Reichhart, 2002). Depuis plusieurs éléments de cette voie ont été caractérisés chez les plantes (Meyers et al., 2002) et d'autres invertébrés (Wajant et al., 1998; Goodson et al., 2005). Cette voie de signalisation est déclenchée par des MAMPs (« Microbe-Associated Molecular Patterns ») (Goodson et al., 2005). Comme nous l'avons mentionné précédemment dans ce manuscrit, chez *C. gigas* des données supportent l'existence de cette voie de signalisation, tout d'abord la caractérisation de deux composants, *oIKK* « oyster I $\kappa$ B Kinase » (Escoubas et al., 1999) et *Cg-Rel* (Montagnani et al., 2004). Par

ailleurs, la disponibilité de séquences de type ESTs (Gueguen et al., 2003) a permis de mettre en évidence quatre autres éléments de cette voie, MyD88, ESCIT, TRAF et I $\kappa$ B. Compte tenu du profil d'expression du gène MyD88 (*Cg-MyD88*) au cours du développement et de la modulation de son expression suite à un challenge bactérien, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ce gène.

Les comparaisons de séquences et les analyses phylogénétiques ont révélé que *Cg-MyD88* appartenait à une famille de protéines qui contient un domaine TIR. Cette famille de protéines est constituée de protéine transmembranaires (récepteurs), tels que les récepteurs de type Toll et le récepteur à l'interleukine-1 (Kaiser et Offermann, 2005), et des protéines cytosoliques (adaptateurs), tels que MyD88, SARM, Mal, TRIF, TRAM (Belvin et Anderson, 1996; Cao et al., 1996). Ces protéines sont impliquées dans les cascades de transduction du signal et notamment dans la voie de NF- $\kappa$ B qui régule des gènes liés à l'immunité (Hayden et al., 2006). *Cg-MyD88* montre les caractéristiques structurales des domaines TIR puisqu'il est composé des trois boîtes (1, 2 et 3). Ces boîtes sont hautement conservées entre les différentes espèces (Xu et al., 2000). Alors que le rôle des boîtes 1 et 3 reste assez peu décrit, celui de la boîte 2 semble mieux défini puisqu'il a été montré que celle-ci est nécessaire pour la formation de la boucle «BB loop», laquelle est essentielle pour la régulation des interactions entre les éléments dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Fitzgerald et al., 2001). Chez l'huître, alors que la boîte 1 est relativement bien conservée, les boîtes 2 et 3 sont très partiellement conservées, ce qui pourrait conduire à une structure divergente de la protéine *Cg-MyD88*. Les fortes homologues de séquences avec les protéines MyD88 et plus particulièrement avec une protéine d'oursin ont conduit à considérer que *Cg-MyD88* était une protéine cytolitique de type MyD88. Cette hypothèse est confortée par les analyses de phylogénie puisque *Cg-MyD88* forme un groupe bien défini entre les protéines MyD88 de mollusques et les autres invertébrés.

Les analyses ont également mis en évidence que *Cg-MyD88* ne possédait qu'un seul domaine, le TIR domaine, alors que les protéines MyD88 typiques sont composées de deux domaines, un domaine DD (Death Domain) dans la région N-terminal, un domaine TIR en C-terminal, reliés par une séquence intermédiaire (Janssens et al., 2002). La séquence d'oursin, montrant les plus fortes homologues avec *Cg-MyD88*, ne contient elle même que ce domaine TIR, alors que chez cette espèce une protéine MyD88 typique a été identifiée (Hibino et al., 2006). De même, chez le mollusque bivalve, *chlamys farreri*, une protéine typique complète a été isolée (Songet et Qiu 2006, Genbank).

L'analyse quantitative de l'expression de *Cg-MyD88* dans les différents tissus de l'huître montre que ce gène s'exprime de façon ubiquitaire. La localisation de l'expression de *Cg-MyD88* conforte ces données. Les transcrits de *Cg-MyD88* ont été détectés dans les tissus qui sont en contact avec le milieu externe tels que les épithélia du manteau et des branchies, tissus qui constituent la première barrière de défense contre l'invasion de microbes. L'expression de *Cg-MyD88* a également été localisée dans les hémocytes circulants et infiltrants. Ce modèle d'expression ubiquitaire de MyD88 est observé chez les vertébrés (Bonnert et al., 1997). Par exemple chez les poissons, l'expression de MyD88 est constitutive dans les tissus liés à l'immunité et dans les épithélia (Takano et al., 2006). Par ailleurs, l'étude de l'expression de *Cg-MyD88* chez l'huître a montré que ce gène est exprimé dans les différents stades de développement mais avec un pic d'expression pendant la métamorphose. Ces résultats suggèrent que *Cg-MyD88* est impliqué dans des processus de développement et de protection de l'hôte *via* probablement la voie de régulation de NF- $\kappa$ B qui est impliquée dans de nombreux processus chez les vertébrés et la drosophile (Morisato et Anderson, 1995; Prothmann et al., 2000).

Dans un premier temps, le caractère inductible de l'expression de *Cg-MyD88* a été mis en évidence par une augmentation importante des messagers dans les stades larve D, larve véligère et naissain après stimulation avec des bactéries. Dans un second temps, une cinétique d'expression de *Cg-MyD88* dans les stades larvaires et le naissain a montré une augmentation du nombre de transcrits dans les 48h suivant la stimulation. Alors que dans les stades larvaires seulement une augmentation de l'expression était observée, dans le naissain cette augmentation était précédée d'une diminution significative de l'abondance des transcrits de *Cg-MyD88*. Ce profil d'expression suggère une modulation du nombre d'hémocytes qui expriment ce gène, notamment un recrutement d'hémocytes dans la deuxième phase, probablement couplé à une régulation transcriptionnelle. Ainsi, la prolifération des hémocytes semble être impliquée dans la réponse immunitaire chez l'huître après stimulation avec des bactéries, comme chez d'autres invertébrés (Muñoz et al., 2002; Söderhäll et al., 2005).

Chez les poissons, une surexpression de MyD88 en réponse à une stimulation avec les lipopolisaccharides (LPS) et les peptidoglycanes (PGN) a été observée, cette surexpression indiquerait que l'expression de MyD88 dépend de la voie de signalisation TLR4. Chez les mammifères TLR4 est essentiel pour la reconnaissance des LPS, qui est la principale composant de la membrane externe des bactéries Gram-négatives (Takeda et Akira, 2001) et MyD88 intervient comme une molécule adaptatrice dans cette signalisation. Sur la base de ces données et en considérant que la voie de signalisation est conservée au cours de l'évolution,

*Cg-MyD88* pourrait être un élément de cette voie de signalisation chez l'huître. Cependant, compte tenu de l'organisation de *Cg-MyD88* avec un unique domaine TIR, du manque de conservation de la boîte 2 qui est impliquée dans la structure de la protéine, et du besoin d'équilibre immunologique raisonnable entre l'activation et l'inhibition des composants de la voie de signalisation pour éviter des réponses inflammatoires néfastes et inadéquates (Liew et al., 2005), *Cg-MyD88* pourrait avoir un rôle divergent des MyD88 classiques. Chez la souris, Janssens et al., (2002), ont mis en évidence le rôle de régulateur négatif d'une protéine MyD88, caractérisée par l'absence de la séquence intermédiaire entre les 2 domaines DD et TIR. Ainsi *Cg-MyD88* pourrait être impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire comme un régulateur négatif, avec une possible interaction de compétition avec une protéine MyD88 typique qu'il reste à identifier chez l'huître. De futurs travaux vont consister à vérifier l'existence d'un ou plusieurs transcrits de ce gène permettant de déduire la présence ou non d'une protéine typique MyD88 chez l'huître. Des recherches seront entreprises afin de déterminer le rôle de cette protéine originale, *Cg-MyD88* et son éventuelle interaction avec la protéine typique putative. Compte tenu des homologies fortes de *Cg-MyD88* avec les protéines de vertébrés et en absence de lignée cellulaire chez les bivalves, il pourra être envisagé d'étudier le rôle de *Cg-MyD88* dans un système cellulaire hétérologue chez les vertébrés.

### **Gènes liés aux réactions de défense au cours du développement chez l'huître**

L'ensemble des résultats nous a permis d'établir une représentation schématique de la réponse immunitaire au cours du développement, en intégrant les gènes déjà connus chez l'huître adulte et des gènes caractérisés au cours de nos travaux et potentiellement impliqués dans la réponse cellulaire et humorale par analogie à ce qui est observé chez d'autres espèces (**Figure 27**).

Les barrières anatomiques, coquille, manteau, branchies et mucus, constituent la première ligne de défense créant une barrière contre l'invasion par des microorganismes (**Figure 27 I**). Au cours du développement dans des conditions normales, l'expression de *Cg-BPI* semble être constitutive chez les larves et le naissain, comme démontré chez les adultes au niveau des épithélia (Gonzalez, 2005). Par contre, la défensine, identifiée dans le manteau chez l'adulte (*Cg-def*), n'a pas été détectée au cours du développement, ainsi qu'après une stimulation avec des bactéries (**Figure 27 Ia**). Les pathogènes échappant à cette première barrière pénètrent dans l'organisme (**Figure 27 1**). Cette pénétration provoque une activation de la seconde ligne

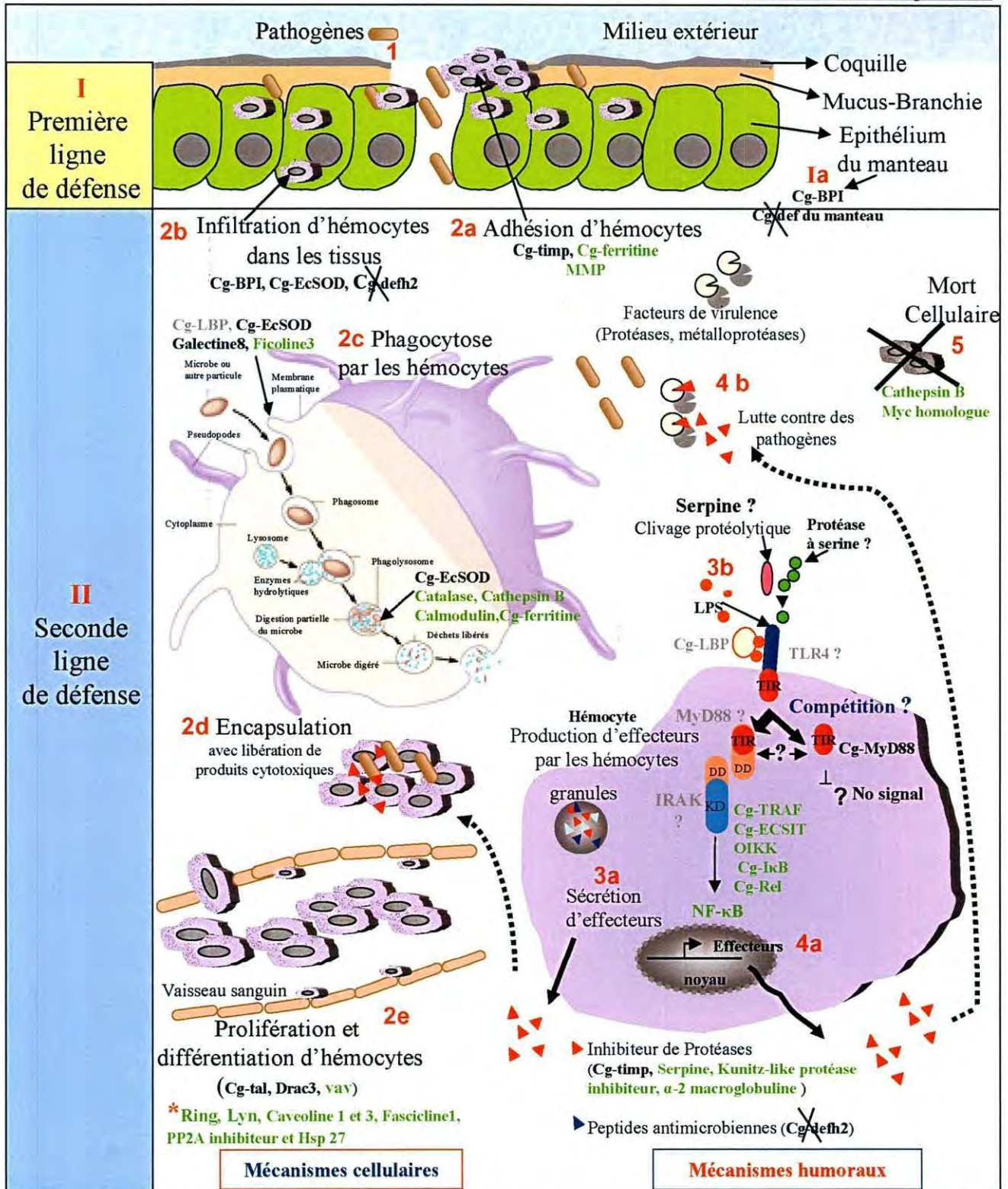


Figure 27. Représentation schématique de l'implication des gènes immunitaires dans les réactions de défense de *Crassostrea gigas* au cours du développement. Dans ce modèle, les barrières anatomiques (coquille, manteau, branchies et mucus) (Ia) constituent la première ligne de défense empêchant les dommages aux tissus et l'invasion par des microorganismes (I). La seconde ligne de défense est assurée par les composants de l'hémolymphe (II). La pénétration de pathogènes dans l'organisme (1) stimule l'activation de deux types de réponse, une cellulaire qui implique l'adhésion des hémocytes intervenant dans la réparation des blessures (2a), l'infiltration d'hémocytes dans les tissus (2b), la phagocytose (2c), l'encapsulation avec la libération de produits cytotoxiques (2d) et la prolifération et la différenciation d'hémocytes (2e). La seconde réponse de type humoral implique la libération d'effecteurs des hémocytes comme des facteurs cytotoxiques (3a) et l'activation (3b) ou inhibition de la voie de signalisation NF-κB. Cette voie conduit à l'expression de gènes immunitaires (4a), dont les produits sont libérés dans l'hémolymphe où ils peuvent participer à l'inactivation des facteurs de virulence ou des microorganismes eux-mêmes (4b). Processus de mort cellulaire par apoptose (5). (\*) Gènes dont le rôle immunitaire reste mal défini et l'expression non localisée. Gènes en noir: expression étudiée et rôle probable dans l'immunité au cours du développement. Gènes en noir et barré X: non exprimés au cours du développement. Gènes en vert: exprimés au cours du développement mais dont le rôle est suggéré par analogie à leur rôle chez l'huître adulte ou d'autres espèces. Gènes en gris: non étudiés au cours du développement mais présents chez l'huître adulte.

de défense qui est assurée par les composants de l'hémolymphe (**Figure 27 II**) et implique des réactions cellulaires et humorales.

(i) Lors de l'adhésion d'hémocytes (**Figure 27 2a**) qui permet la réparation des blessures des tissus, un gène comme *Cg-timp*, régulateur de l'activité des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (*MMPs* « Matrix Metalloproteinases ») permettrait l'équilibre de l'homéostasie de la matrice extracellulaire, et ainsi interviendrait dans la réparation tissulaire au cours du développement comme chez l'adultes (Montagnani et al., 2001). La *Cg-ferritine*, exprimée au cours du développement pourrait participer dans le processus de formation/réparation de la coquille comme chez l'huître perlière (Zhang et al., 2003).

(ii) Infiltration des hémocytes dans les tissus et phagocytose (**Figure 27 2b, 2c**). Au cours du développement l'expression de *Cg-BPI* est induite après une infection bactérienne, cette induction pourrait être localisée dans les hémocytes et plus particulièrement dans les hémocytes infiltrant comme observé chez l'adulte (Gonzalez, 2005). Par contre, *Cg-defh2* exprimée dans les hémocytes de l'huître adulte (Gonzalez et al., 2007), dont l'expression est modulée après une stimulation bactérienne, n'a pas été détectée chez les larves et le naissain. L'expression de *Cg-EcSOD* au cours du développement est faible, voire nulle, dans certains stades sauf dans les larves métamorphosées et le naissain dans lequel des transcrits *Cg-EcSOD* ont été détectés dans les hémocytes infiltrants. Par analogie à ce qui a été démontré chez adulte, *Cg-EcSOD* pourrait être impliqué dans le processus de phagocytose (Gonzalez et al., 2005). La phagocytose est un processus de plusieurs étapes (**Figure 27 2c**) dans lequel plusieurs gènes pourraient être impliqués. Le gène *Cg-EcSOD* via les intégrines (Gonzalez et al., 2005) et des lectines (*galectine8* et *Ficoline3*) pourraient intervenir dans la reconnaissance et la fixation du non-soi sur l'hémocyte. Une fois que la particule étrangère est internalisée, sa dégradation a lieu à l'intérieur du phagolysosome soit par des enzymes lysosomales tels que la *Cathepsine B*, qui est une cystéine protéase lysosomal (Oren et al., sous presse), soit par une forte réaction oxydative conduisant à la production de formes intermédiaires réactives d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène dans laquelle pourraient intervenir des gènes tels que *Cg-EcSOD*, *catalase*, *calmoduline* et *ferritine* qui est impliquée dans la protection contre le stress oxydatif (Orino et al., 2001).

(iii) L'encapsulation pourrait être un élément de la réponse immunitaire avec la production et la libération de produits cytotoxiques dans l'espace extracellulaire tels que des inhibiteurs de protéases (*Cg-timp*,  *$\alpha$ -2-macroglobuline*, *serpine*, *Kunitz-like protéase inhibiteur*) (**Figure 27 2d ; 3a**).

(iv) La prolifération et la différenciation d'hémocytes semblent induites au cours du développement suite à une infection, et ainsi l'hématopoïèse pourrait être impliquée dans la réponse immunitaire. L'augmentation de l'expression des gènes *Cg-tal* et *Drac3* qui sont des gènes marqueurs d'hémocytes, et qui interviennent aussi dans leur différenciation et maturation a été observée (Porcher et al., 1996; Sasamura et al., 1997). Le gène *vav-2* dont l'expression a été détectée pourrait aussi être impliqué dans une cascade de signalisation qui chez les mammifères est liée à la régulation de la survie, de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes, et dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Doody et al., 2001) (**Figure 27 2e**).

De plus, la stimulation des cellules immunocompétentes par des bactéries conduirait à l'activation de la voie de signalisation Rel/NF- $\kappa$ B (**Figure 27 3b**). Au cours de cette activation, le récepteur TLR-4, non mis en évidence chez *C. gigas* mais présent chez *C. virginica* (Tanguy et al., 2004), est associé aux LPS des bactéries, conduisant à l'activation des molécules adaptatrices (MyD88, Cg-TRAF, Cg-ECSIT) qui vont être recrutées successivement pour aboutir à la formation d'un complexe lié au récepteur. La formation de ce complexe permet l'activation de la cascade de phosphorylation par l'intermédiaire de kinases, aboutissant à l'activation du complexe  $\alpha$ IKK, la dégradation de l'inhibiteur Cg-I $\kappa$ B et la dissociation du facteur de transcription Cg-Rel de son inhibiteur Cg-I $\kappa$ B (Montagnani, 2002). Cg-Rel serait impliqué au niveau des hémocytes dans la régulation des gènes immunitaires portant des sites  $\kappa$ B tels que *Cg-timp* (Montagnani et al., 2007) (**Figure 27 4a**) ou des peptides antimicrobiens comme démontré chez la drosophile (Hoffmann et al., 1993 ; Hoffmann et Reichhart, 2002). Ainsi ces effecteurs pourraient intervenir dans la lutte contre les pathogènes et/ou leurs facteurs de virulence (**Figure 27 4b**).

Chez la drosophile, l'activation du ligand de la voie Toll, *spätzle*, est attribuée à l'action d'une protéase à serine régulée par une serpine Spn43 Ac (Levashina et al., 1999). Une serpine a été identifiée au cours du développement, cependant son rôle reste à démontrer (**Figure 27 3b**).

Il faut souligner que *Cg-MyD88* décrit dans ces travaux est constitué d'un seul domaine (TIR), et donc pourrait intervenir comme un régulateur négatif de la cascade Rel/NF- $\kappa$ B et pourrait éventuellement intervenir en compétition avec une protéine MyD88 typique dont l'existence reste à démontrer chez l'huître (**Figure 27 3b**).

Les cellules immunocompétentes sont impliquées dans des réactions de défense et certaines d'entre elles seraient éliminées (Cheng, 1981). Deux gènes identifiés au cours de ce

travail, *Cathepsine B* et *myc homologue* pourraient être impliqués dans des processus d'apoptose ou mort cellulaire (**Figure 27 5**).

### **Perspectives**

A ce jour, l'ensemble des données acquises dans ce travail nous a permis de mettre en évidence l'implication des hémocytes, cellules immunocompétentes, et de plusieurs gènes dans la réponse immunitaire au cours du développement et plus particulièrement impliqués dans la réponse de l'hôte vis-à-vis des agents microbiens tels que des bactéries. Ces données contribuent à améliorer les connaissances sur la compréhension du système immunitaire chez les jeunes stades, permettant d'entrevoir les raisons possibles des différences de susceptibilité entre les différentes étapes de la production de ces organismes d'intérêt aquacole. Cependant, plusieurs voies de recherche restent à réaliser tant sur le plan fondamental que appliqué.

Les gènes identifiés dans ce travail devront être caractérisés plus précisément, puisque les séquences sont majoritairement issues de banques ESTs et donc incomplètes. Nous avons suggéré l'implication de ces gènes dans le développement et/ou dans l'immunité, il reste à établir leur fonction afin de construire les réseaux de gènes intervenant dans la réponse immunitaire et donc contribuer à accroître la compréhension du système immunitaire. En raison de l'absence de lignées cellulaires chez les bivalves, il semble approprié d'étudier la fonctionnalité de ces gènes en utilisant des systèmes hétérologues (cellules d'insectes et de vertébrés) tels que réalisés par Montagnani et al., (2004) ou améliorer des systèmes homologues tels que les primocultures d'hémocytes ou d'embryons. Le développement de la technique RNA interférence devrait largement contribuer, par l'inhibition de la fonction des gènes, à comprendre l'implication de ces gènes dans divers processus physiologiques. Des travaux focalisés sur l'étude de la régulation de la cascade de signalisation NF- $\kappa$ B, montrent un grand intérêt, du fait que cette voie de signalisation active l'expression des gènes immunitaires mais aussi des gènes impliqués dans le développement, et pourraient permettre de mettre en évidence d'autres rôles des composants de cette cascade. De plus, l'évidence de cette voie de signalisation chez les mollusques (Montagnani et al., 2004; Goodson et al., 2005) et sa conservation au cours de l'évolution ouvre des nouvelles perspectives en immunologie comparée pour la compréhension de la régulation des mécanismes de défense et la susceptibilité variable entre les différents stades de l'huître.

Dans le cadre de l'aquaculture, en raison de l'importance économique de la conchyliculture et des conséquences dramatiques des pathologies qui affectent son développement, une des perspectives importantes d'application se situe en sélection génétique,



par le développement de marqueurs moléculaires permettant d'assister la sélection. Puisque la plupart des stocks naturels d'huîtres sont surexploités ou à la limite maximale de leur exploitation durable (FAO, 2005), l'apport du naissain, pour couvrir les demandes en hausse de la production d'huître, viendra des écloséries. Le développement des écloséries rend possible la réalisation de programmes de sélection pour améliorer les souches d'huîtres, dans lesquels une attention particulière peut être focalisée sur les premiers stades de développement, pour produire des larves en bonne santé, capables de se métamorphoser et de croître rapidement jusqu'à la taille commerciale à une échelle économiquement rentable. Dans ce but, plusieurs gènes acquis dans ce travail sont des candidats potentiels (i) pour la sélection génétique de souches d'huîtres plus résistantes aux maladies, (ii) comme marqueurs de l'état physiologique et de bonne santé des différents stades de développement, (iii) pour la fabrication d'outils performants et rapides, tels que la puce à ADN, PCR en temps réel à haut débit ou array PCR, permettant l'analyse du transcriptome des populations d'huîtres face à différents stress (pratiques culturales ou facteurs environnementaux, polluants chimiques, hypoxie, pathogènes...) qui influent l'état de santé des animaux et les rendent plus susceptibles aux mortalités. Le contrôle de l'état sanitaire des huîtres pourrait contribuer à pérenniser une filière conchylicole performante.

**LISTE DES PUBLICATIONS**

Articles publiés:

Montagnani C., **Tirapé A.**, Boulo V. and Escoubas J.M. (2005) The two Cg-timp mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*. **29**: 831-839.

**Tirapé A.**, Bacque C., Brizard R., Vandebulcke F. and Boulo V. (2007) Expression of immune-related genes in the Oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*. DCI-D-06-00187 Feb. 20.

Teresa Thiel, Noah K. Whiteman, **Ana Tirapé**, Maria Ines Baquero, Virna Cedeño, Tim Walsh, Gustavo Jiménez, and Patricia G. Parker. (2005) Characterization of Canarypox-like viruses infecting endemic birds in the Galapagos Islands. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(2), 342-353.

Articles en Préparation pour soumission ou soumis:

**Tirapé A.**, Lallemand P., Phelipot P., de Lorgeril J., and Boulo V. (2007) Molecular identification and expression study of genes differentially expressed in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during the ontogenesis. *Gene*.

**Tirapé A.**, Montagnani C., Lallemand P. and Boulo V. (2007) A novel gene, *Cg-MyD88* in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* with a potential role in immunity. *FEBS Letters*.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**-A-**

Acharya, S., Mohanty, J. and Sahoo, P. (2004) Humoral defence factors in Indian river prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Fish Shellfish Immunol.* **17**: 137-147.

Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* **406**: 782-787.

Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N. and de Rosa, R. (1999) Animal evolution: the end of the intermediate taxa? *Trends in Genetics.* **15**: 104-108.

Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B. and de Rosa, R. (2000) The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci.* **97**: 4453-4456.

Allam, B., Ashton-Alcox, K. and Ford, S. (2002) Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* **13**: 141-158.

Anderson, R.S., Paynter, K.T. and Bureson, E.M. (1992) Increased Reactive Oxygen Intermediate Production by Hemocytes Withdrawn from *Crassostrea virginica* Infected with *Perkinsus marinus*. *Biological Bulletin.* **183**: 476-481.

Angerer, L.M., Kawczynski, G., Wilkinson, D.G., Nemer, M. and Angerer, R.C. (1986) Spatial patterns of metallothionein mRNA expression in the sea urchin embryo. *Developmental Biology.* **116**: 543-547.

Arzul, I., Renault, T., Lipart, C. and Davison, A.J. (2001) Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J Gen Virol.* **82**: 865-870.

Arzul, I., Renault, T., Thebault, A. and Gerard, A. (2002) Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research.* **84**: 151-160.

Asakawa, M., Beppu, R., Ito, K., Tsubota, M., Takayama, H. and Miyazawa, K. (2006) Accumulation of paralytic shellfish poison (PSP) and biotransformation of its components in oysters, *Crassostrea gigas*, fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* **47**: 28-32.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., *et al* (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature.* **25**: 25-29.

Avendaño, R. and Riquelme, C. (1999) Establishment of mixedculture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research.* **30**: 893-900.

Azevedo, C. and Villalba, A. (1991) Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Journal of Invertebrate Pathology.* **58**: 75-81.

**-B-**

Babior, B. (1984) The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest.* **73**: 599-601.

- Bachere, E., Chagot, D. and Grizel, H. (1988) Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Developmental & Comparative Immunology*. **12**: 549-559.
- Bachère, E., Boulo, V., Godin, P., Goggin, L., Hervio, D., Le Gall, G., *et al* (1991) *In vitro* chemiluminescence studies of marine bivalve defence mechanisms and responses against specific pathogens. *Dev. Comp. Immunol.* **15**: S102.
- 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**: 149-168.
- Badariotti, F., Kypriotou, M., Lelong, C., Dubos, M.-P., Renard, E., Galera, P. and Favrel, P. (2006) The Phylogenetically Conserved Molluscan Chitinase-like Protein 1 (Cg-Clp1), Homologue of Human HC-gp39, Stimulates Proliferation and Regulates Synthesis of Extracellular Matrix Components of Mammalian Chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **281**: 29583-29596.
- Bakke, T. (1990) Pogonophora. In Adiyodi, K. G. & R. Adiyodi (eds), Reproductive Biology of Invertebrates, John Wiley and Sons, Chichester. **IV**: 37-48.
- Barber, B.J., Ford, S.E. and Littlewood, D.T. (1991) A physiological comparison of resistant and susceptible oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) exposed to the endoparasite *Haplosporidium nelsoni* (Haskin, Stauber & Mackin). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **146**: 101-112.
- Barg, U. and Lavilla-Pitogo, C.R. (1996) The use of chemicals in aquaculture: A summary brief of two international expert meetings. *FAO Aquaculture Newsletter*. **14**: 12-13.
- Barondes, S., Cooper, D., Gitt, M. and Leffler, H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **269**: 20807-20810.
- Barreau-Roumiguere, C., Montagnani, C. and Escoubas, J.-M. (2003) Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 793-800.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. and Lipshitz, H. (2001) Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci.* **98**: 7025-7028.
- Bayne, C.J., Hahn, U.K. and Bender, R.C. (2001) Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology*. **123**: 159-167.
- Beamer, L. (2003) Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans.* **31**: 791-794.
- Beckmann, N., Morse, M. and Moore, C. (1992) Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **59**: 124-132.

- Belvin, M.P. and Anderson, K.V. (1996) A conserved signaling pathway: The Drosophila Toll-Dorsal Pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **12**: 393-416.
- Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* **40**: 845-859.
- Blaise, C., Trottier, S., Gagne, F., C., L. and PD., H. (2002) Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay. *Environ Toxicol*. **17**: 160-169.
- Bonnert, T.P., Garika, K.E., Parnet, P., Sonoda, G., Testa, J.R. and Sims, J.E. (1997) The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Letters*. **402**: 81-84.
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J.M., Bâcher, C. and Jonquieres, G. (1995) Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. **134**: 143-154.
- 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**: 76-85.
- Boutet, I., Tanguy, A. and Moraga, D. (2004) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene*. **329**: 147-157.
- Bower, S.M., McGladdery, S.E. and Price, I.M. (1994) Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*. **4**: 1-199.
- Bower, S.M. and McGladdery, S.E. (2003) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish.
- Bower, S.M. (2003) Mikrocytosis (Mikrocytos mackini). *Annual Reports of OIE Reference Laboratories and Collaborating Centres 2002*: 403-405.
- Bowie, A. and O'Neill, L. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*. **67**: 508-514.
- Boyer, B.C. and Henry, J.Q. (1998) Evolutionary modifications of the spiralian developmental program. *Am. Zool*. **38**: 621-633.
- Bramble, L. and Anderson, R.S. (1997) Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. *Developmental & Comparative Immunology*. **21**: 337-348.
- Brandenburg, K., Koch, M.H. and Seydel, U. (1998) Biophysical characterisation of lysozyme binding to LPS Re and lipid A. *Eur J Biochem*. **258**: 686-695.
- Brew, K., Dinakarpanian, D. and Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. **1477**: 267-283.

Brown, C. (1979) Ultraviolet light: an effective disinfectant for shellfish hatcheries? *Ozonews*. **2**: 6-7.

Brown, C. and Russo, D. (1979) Ultraviolet light disinfection of shellfish hatchery seawater. I. Elimination of five pathogenic bacteria. *Aquaculture*. **17**: 17-23.

Burke, R.D. (1983) The induction of metamorphosis of the marine invertebrate larvae: stimulus and response. *Can. J. Zool.* **61**: 1701-1719.

Butler, R.A. and Roesijadi, G. (2001) Disruption of Metallothionein Expression with Antisense Oligonucleotides Abolishes Protection Against Cadmium Cytotoxicity in Molluscan Hemocytes. *Toxicol. Sci.* **59**: 101-107.

-C-

Cabib, E., Roberts, R. and Bowers, B. (1982) Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 763-793.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. and Pruzzo, C. (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*. **57**: 469-476.

Canicatti, C. (1990) Distribution d'une activité lysozymiale dans un échinoderme holothuroïde, *Holothuria polii*, et dans les oeufs et les larves d'un échinoderme échinoïde, *Paracentrotus lividus*. *European Archives de Biologie*. **101**: 309-318.

Cao, Z., Henzel, W. and Gao, X. (1996) IRAK: A Kinase Associated with the Interleukin-1 Receptor. *Science*. **271**: 1128-1131.

Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. and Villalba, A. (1997) Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **70**: 96-105.

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* (Asctospora). Thèse de l'*Ecole pratique des hautes études*. 72p.

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*. **59**: 241-249.

Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. and Bulet, P. (1996) Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**: 21808-21813.

Cheney, D.P., MacDonald, B.F. and Elston, R.A. (2000) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) : Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J. Shellfish Res.* **19**: 353-359.



- Cheng, T.C. (1981) *Bivalves*. Academic Press, London.
- Cheng, T.C. (1983) Internal defense mechanisms of molluscs against invading microorganisms: personal reminiscences. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* **102**: 185-193.
- Cheng, T.C. (1988) *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytic and endocytotic indices. *Journal of Invertebrate Pathology*. **51**: 215-220.
- Cheng, T.C. (1996) Hemocytes: forms and functions. In Kennedy, V. S., Newell, RIE & Eble, F. (eds). The eastern oyster: *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park.: 299-333.
- Cheng, T.C. and Downs, J.C.U. (1988) Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*. **52**: 163-167.
- Cheng, T.C. and Rodrick, G.E. (1975) Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **52**: 443-447.
- 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**: 26-32.
- Comps, M. (1980) Les infections virales associées aux épizooties des huîtres du genre *Crassostrea*. International Council for the Exploration of the Sea. *Spec. Meeting on Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish, Copenhagen No. 6*.
- Comps, M. (1988) Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *American Fisheries Society Special Publication*. **18**: 23-37.
- Comps, M. and Bonami, J.R. (1977) Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea angulata*. *Th. C. R. Acad. Sci. D.* **285**: 1139-1140.
- Comps, M. and Duthoit, J.L. (1976) Virus infection associated with 'gill disease' of the Portuguese Oyster *Crassostrea angulata*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*. **283**: 1595-1596.
- Conklin, E.G. (1897) The embryology of *Crepidula*. *J. Morph.* **13**: 1-226.
- Conway Morris, S. (2000) The Cambrian "explosion": slow-fuse or megatonnage? *Proc Natl Acad Sci*. **97**: 4426-4429.
- Cooper, D. and Barondes, S. (1999) God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*. **9**: 979-984.
- Costello, D.P. and Henley, C. (1976) Spiralian development: a perspective. *Am. Zool.* **16**: 277-291.

Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C. and Rofe, A.M. (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **59**: 627-647.

Cromack, D.T., Pierce, G.F. and Mustoe, T.A. (1991) TGF-beta and PDGF mediated tissue repair: identifying mechanisms of action using impaired and normal models of wound healing. *Prog. Clin. Biol. Res.* **365**: 359-373.

Cserjesi, P., Fang, H. and Brandhorst, B.P. (1997) Metallothionein gene expression in embryos of the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Molecular Reproduction and Development*. **47**: 39-46.

Cuesta, A., Esteban, M.A. and Meseguer, J. (2003) In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. **15**: 1-11.

**-D-**

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

Davidson, E. (1986) Gene activity in early development. *Academic Press, New York*. 670 pp.

Davis, H., Loosanoff, V., William, H. and Christopher, M. (1954) A fungus disease in clam and oyster larvae. *Science*. **120**: 36-38.

De, S.K., Enders, G.C. and Andrews, G.K. (1991) High levels of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse. *Mol. Endocrinol.* **5**: 628-636.

de Bruijn, M.F.T.R., Ma, X., Robin, C., Ottersbach, K., Sanchez, M.-J. and Dzierzak, E. (2002) Hematopoietic Stem Cells Localize to the Endothelial Cell Layer in the Midgestation Mouse Aorta. *Immunity*. **16**: 673-683.

De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M. and Lemaitre, B. (2001) Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *PNAS*. **98**: 12590-12595.

de Rosa, R., Grenier, J.K., Andreeva, T., Cook, C.E., Adoutte, A., Akam, M., *et al* (1999) Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. **399**: 772-776.

Dégremont, L. (2003) Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat de l'Université de Caen. 333p.

Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., *et al* (2005) Relative importance of family, site and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. **249**: 213-229.

DiSalvo, L., Blecka, J. and Zebal, R. (1978) *Vibrio anguillarum* and Larval Mortality in a California Coastal Shellfish Hatchery. *Appl Environ Microbiol.* **35**: 219-221.

- Dommett, R., Klein, N. and Turner, M. (2006) Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*. **68**: 193-209.
- Doody, G.M., Bell, S.E., Vigorito, E., Clayton, E., McAdam, S., Tooze, R., *et al* (2001) Signal transduction through Vav-2 participates in humoral immune responses and B cell maturation. **2**: 542-547.
- Douillet, P. (1993) Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **98**: 123-134.
- Douillet, P.A. and Langdon, C.J. (1994) Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*. **119**: 25-40.
- Dumollard, R., Ward, Z., Carroll, J. and Duchen, M.R. (2007) Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*. **134**: 455-465.
- Dungan, C.F. and Elston, R.A. (1988) Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of the hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. **72**: 1-14.
- Dungan, C.F., Elston, R.A. and Schiewe, M.H. (1989) Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by cytophaga-like bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1128-1135.
- Dyrynda, E. (1985) Chemical defences and the structure of subtidal epibenthic communities. In Proceedings of the 19th European Marine Biology Symposium (P.E. Gibb, ed.) pp. 411-424. Cambridge: Cambridge University Press.
- Dyrynda, E.A., Pipe, R. and Ratcliffe, N.A. (1995) Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae. *Fish & Shellfish Immunology*. **5**: 569-580.

-E-

- Elsbach, P. and Weiss, J. (1993) The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiology*. **187**: 417-429.
- Elston, R. (1979) Economically important larval bivalve diseases and their control. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia*. **14**: 47-54.
- Elston, R.A. (1980) Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster, *Crassostrea virginica*. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* **70**: 65-93.
- Elston, R.A. (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases*. **3**: 259-276.
- Elston, R. (1999) *Health management, development and histology of seed oysters*. Louisiana USA: The World Aquaculture Society, 110p.

Elston, R.A. and Leibovitz, L. (1980) Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37**: 964-978.

Elston, R., Leibovitz, L., Relyea, D. and Zatila, J. (1981) Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: diagnostic tools and management features. *Aquaculture*. **24**: 53-62.

Elston, R.A. and Wilkinson, M.T. (1985) Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). *Aquaculture*. **48**: 189-210.

Engstad, R.E. and Robertsen, B. (1993) Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 319-330.

Ernande, B. (2001) Développement, plasticité phénotypique et évolution. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle. 274 p.

Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J. and Haure, J. (2004) Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *Journal of Evolutionary Biology*. **17**: 342-356.

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 Letters*. **453**: 293-298.

Esteban, M.A., Mulero, V., Cuesta, A., Ortuno, J. and Meseguer, J. (2000) Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. **10**: 543-554.

Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuno, J. and Meseguer, J. (2001) Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish & Shellfish Immunology*. **11**: 303-315.

Estes, R.M., Friedman, C.S., Elston, R.A. and Herwig, R.P. (2004) Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ.* **58**: 223-230.

**-F-**

FAO, (2005) Yearbooks of fishery statistics summary tables-2003: World aquaculture production of fish, crustaceans, mollusks, etc... by principal species <http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>.

Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, J.R. and Foster, W.S. (1972) Oyster herpes-type virus. *Science*. **178**: 759-760.

Farley, C.A. (1978) Viruses and virus-like lesions in marine molluscs. *Mar. Fish. Rev.* **40**: 18-20.

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.). U.S. National Marine. *Fish Service Bulletin*. **86**: 581-593.

Feng, S.Y. (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. In W. S. Fisher (ed.). *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs. Amer. Fish. Soc. Spec. Publ. 18, Bethesda, Maryland*: 153-168.

Fisher, W.S. (1986) Structure and functions of oyster hemocytes. In Brehélin, M. (ed). *Immunity in Invertebrates, Vol 3. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg*, p. 25-35.

Fisher, W.S. and Ford, S.E. (1988) Flow cytometry: a tool for cell research in bivalve pathology. In: W. S. Fisher, Editor, *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs. American Fisheries Society Bethesda*. **18**: 282-292.

Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., *et al* (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. **413**: 78-83.

Fleer, A. (2000) Cellular and humoral defence mechanisms against bacteria. *Paediatric Respiratory Reviews*. **1**: 235-240.

Ford, S.E. and Haskin, H.H. (1982) History and epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an oyster pathogen in Delaware Bay, 1957-1980. *Journal of Invertebrate Pathology*. **40**: 118-141.

Ford, S. and Haskin, H. (1987) Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *J. Parasitol.* **73**: 368-376.

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. *Journal of Invertebrate Pathology*. **61**: 49-57.

Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. **64**: 97-112.

Friedman, C.S. (1996) Haplosporidian infection of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in California and Japan. *Journal of Shellfish Research*. **15**: 597-600.

Friedman, C., Beaman, B., Chun, J., Goodfellow, M., Gee, A. and Hedrick, R. (1998) *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *Int J Syst Bacteriol.* **48**: 237-246.

Frlan, R. and Gobec, S. (2006) Inhibitors of Cathepsin B. *Current Medicinal Chemistry*. **13**: 2309-2327.

Fryer, S.E. and Bayne, C.J. (1996) Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components. *Developmental & Comparative Immunology*. **20**: 23-37.

Fujita, T., Matsushita, M. and Yuichi, E. (2004) The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews*. **198**: 185-202.

Fukami, K., Nishijima, T. and Ishida, Y. (1997) Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microscopic algae. *Hydrobiol.* **358**: 185-191.

Furuya, H., Tsuneki, K. and Koshida, Y. (1996) The cell lineages of two types of embryo and a hermaphroditic gonad in dicyemid mesozoans. *Development Growth & Differentiation*. **38**: 453-463.

**-G-**

Garate-Lizarraga, I., Bustillos-Guzman, J.J., Alonso-Rodriguez, R. and Luckas, B. (2004) Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*. **48**: 397-402.

Garland, C., Nash, G., Summer, C. and McMeekin, T. (1983) Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian Hatchery. *Marine and Freshwater Research*. **34**: 483-487.

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 & Comparative Immunology*. **18**: 277-286.

Gay, M. (2004) Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas*: étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle. 214 p.

Gay, M., Berthe, F. and Le Roux, F. (2004) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*. **59**: 46-56.

Gibson, L.F., Woodworth, J. and George, A.M. (1998) Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*. **169**: 111-120.

Glinski, Z. and Jarosz, J. (1997) Molluscan immune defenses. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **45**: 149-155.

Glude, J.B. (1975) A summary report of pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972 Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan, p 1-28.

Goedken, M. and De Guise, S. (2004) Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology*. **16**: 539-552.

Gonzalez, M. (2005) Etude de la réponse immunitaire chez l'huître *Crassostrea gigas*: caractérisation et fonctions de protéines de reconnaissance aux LPS et d'effecteurs antimicrobiens. Thèse de doctorat. Université de Montpellier II, 168 p.

Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.-C., Gueguen, Y. and Bachere, E. (2005) Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **338**: 1089-1097.

Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., de Lorgeril, J., Romestand, B. and Bachere, E. (2007) Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*. **31**: 332-339.

Goodson, M., Kojadinovic, M., Troll, J., Scheetz, T., Casavant, T., Soares, M. and McFall-Ngai, M. (2005) Identifying components of the NF-kappaB pathway in the beneficial Euprymna scolopes-Vibrio fischeri light organ symbiosis. *Appl Environ Microbiol*. **71**: 6934-6946.

Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. and Taillade, S. (1998) Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes Oléron (France). *ICES Mariculture Committee CM1998/CC.*: 14-21.

Gouletquer, P., Wolowicz, M., Latala, A., Geairon, P., Huvet, A. and Boudry, P. (1999) Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Japanese, Spanish and Taiwanese origins. *Aquatic Living Resources*. **12**: 271-277.

Grassé, P. (1960) Traité de zoologie. Mollusques Lamellibranches. In. Eds, M.e.C. (ed.) Paris,, pp. 2219 p.

Grizel, H. (1979) Marteilia refringens and oyster disease. Recent observations. *Mar.Fish.Rev*. **41**: 38-39.

Grizel, H. and Héral, M. (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer*. **47**: 399-403.

Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.-L., Garnier, J., *et al* (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*. **303**: 139-145.

Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J.-M., *et al* (2006) Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*: Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J. Biol. Chem*. **281**: 313-323.

**-H-**

Hashimoto, Y. (1979) Marine Toxins and Other Bioactive Metabolites. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.

Hayden, M.S., West, A.P. and Ghosh, S. (2006) NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene*. **25**: 6758-6780.

Hedgecock, D., Gaffney, P., Gouletquer, P., Gou, X., Reece, K. and Warr, G. (2005) The case for sequencing the pacific oyster genome. *Journal of Shellfish Research*. **24**: 429-441.

- Henry, J.J. (1986) The role of unequal cleavage and the polar lobe in the segregation of developmental potential during first cleavage in the embryo of *Chaetopterus variopedatus*. *Development Genes and Evolution*. **195**: 103-116.
- Henry, J.J. and Martindale, M.Q. (1999) Conservation and innovation in spiralian development. *Hydrobiologia*. **402**: 255-265.
- Héral, M. and Deslous-Paoli, J.M. (1990) Oyster culture in European countries in: Estuarine and marine bivalves mollusk culture. *W. Menzel, ed., CRD Press New York*: 153-190.
- 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. *Mechanisms of Development*. **122**: 695-705.
- Hervio, D. (1992) Contribution a l'etude de *Bonamia ostreae* (Asctospora), protozoaire parasite de l'huître *Ostrea edulis* (Bivalvia), et a l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal, 170 p.
- Hibbetts, K., Hines, B. and Williams, D. (1999) An overview of proteinase inhibitors. *J Vet Intern Med*. **13**: 302-308.
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A.J., Cohen, A.H., Terwilliger, D.P., *et al* (2006) The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Developmental Biology*. **300**: 349-365.
- Hill, B.J. (1976) Mollusc viruses: their occurrence, culture and relationships. *Proc. 1st Int. Colloq. Invertebrate Pathology*: 25-29.
- Hine, P.M. (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. **9**: 367-385.
- Hine, P.M., Wesney, B. and Hay, B.E. (1992) Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **12**: 135-142.
- Hine, P.M., Bower, S.M., Meyer, G.R., Cochenec-Laureau, N. and Berthe, F.C.J. (2001) Ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea spp.* and *Ostrea spp.* in British Columbia, Canada. *Dis Aquat Organ*. **45**: 215-227.
- His, E. and Robert, R. (1985) Développement des véligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* **47**: 63-88.
- Hoffmann, J.A., Hetru, C. and Reichhart, J.-M. (1993) The humoral antibacterial response of *Drosophila*. *FEBS Letters*. **325**: 63-66.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A.J. and Ezekowitz, R.A.B. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. **284**: 1313-1318.



Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.M. (2002) Drosophila innate immunity: An evolutionary perspective. *Nature Immunology*. **3**: 121-126.

Hold, G.L., Smith, E.A., Rappe, M.S., Maas, E.W., Moore, E.R.B., Stroempl, C., *et al* (2001) Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiology Ecology*. **37**: 161-173.

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**: 211-220.

Hyman, L.H. (1940) in *The Invertebrates* (McGraw-Hill, New York), pp. 22-43.

**-I-**

Imai, T., Numachi, K., Oizumi, J. and Sato, S. (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute*. **25**: 27-38.

Inagawa, H., Honda, T., Kohchi, C., Nishizawa, T., Yoshiura, Y., Nakanishi, T., *et al* (2002) Cloning and Characterization of the Homolog of Mammalian Lipopolysaccharide-Binding Protein and Bactericidal Permeability-Increasing Protein in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Immunol.* **168**: 5638-5644.

Iovine, N., Elsbach, P. and Weiss, J. (1997) An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**: 10973-10978.

Ip, Y.T. and Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) -- from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*. **10**: 205-219.

Irianto, A. and Austin, B. (2002) Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. **25**: 633-642.

**-J-**

Jaffredo, T., Bollerot, K., Sugiyama, D., Gautier, R. and Drevon, C. (2005) Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int J Dev Biol*. **49**: 269-277.

Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J. and Beyaert, R. (2002) Regulation of Interleukin-1- and Lipopolysaccharide-Induced NF-[kappa]B Activation by Alternative Splicing of MyD88. *Current Biology*. **12**: 467-471.

Jeffries, V.E. (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. **29**: 201-226.

Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Lacy, E.R., Lewitus, A.J., Kempton, J.W., Gross, P.S., *et al* (2002) Potential Indicators of Stress Response Identified by Expressed Sequence Tag Analysis of Hemocytes and Embryos from the American Oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology*. **4**: 81-93.

Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Schey, K., Warr, G.W. and Chapman, R.W. (2004) Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *European Journal of Biochemistry*. **271**: 1702-1712.

Jenny, M.J., Chapman, R.W., Mancina, A., Chen, Y.A., McKillen, D.J., Trent, H., *et al* A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *In Press*.

Jian, J.C. and Wu, Z.H. (2003) Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture*. **218**: 1-9.

**-K-**

Kaiser, W.J. and Offermann, M.K. (2005) Apoptosis Induced by the Toll-Like Receptor Adaptor TRIF Is Dependent on Its Receptor Interacting Protein Homotypic Interaction Motif. *J. Immunol*. **174**: 4942-4952.

Kanost, M.R. (1999) Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental & Comparative Immunology*. **23**: 291-301.

Kisugi, J., Ohye, H., Kamiya, H. and Yamazaki, M. (1989) Biopolymers from marine invertebrates. X. Mode of action of an antibacterial glycoprotein, aplysianin E, from eggs of a sea hare, *Aplysia kurodai*. *Chem Pharm Bull*. **37**: 3050-3053.

Koganezawa, A. (1974) Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. In *Japan Meeting on Aquaculture*. U.S, T. (ed.) Tokyo, Japan, pp. 29-34.

Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law, S.H.W. and Wu, R.S.S. (2002) Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research*. **36**: 2802-2812.

Kueh, C. and Chan, K. (1985) Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J Appl Bacteriol*. **59**: 41-47.

Kulkarni, A.D., Fanslow, W.C., Rudolph, F.B. and Buren, C.T. (1987) Modulation of delayed hypersensitivity in mice by dietary nucleotide restriction. *Transplantation*. **44**: 847-849.

**-L-**

Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. and Nicolas, J.-L. (2006) Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection*. **8**: 2715-2724.

- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., *et al* (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ.* **46**: 139-145.
- 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 Immunology.* **15**: 225-240.
- Langdon, C., Evans, F., Jacobson, D. and Blouin, M. (2003) Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. *Aquaculture.* **220**: 227-244.
- Lauckner, G. (1983) Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: O. Kinne (Eds.). Diseases of Marine Animals Biologische Anstalt Helgoland Hamburg, pp. 477-963.
- Le Deuff, R.-M., Nicolas, J.L., Renault, T. and Cochenec, N. (1994) Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **14**: 69-72.
- Le Deuff, R., Renault, T. and Cochenec, N. (1995) Antibodies specific for channel catfish virus cross-react with Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. *Vet Res.* **26**: 526-529.
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A. and Berthe, F. (1999) DNA Probes As Potential Tools for the Detection of *Marteilia refringens*. *Mar Biotechnol.* **1**: 588-597.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., *et al* (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources.* **15**: 251-258.
- Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Muyzer, G., Bernard, L., *et al* (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in abundances, activity and composition. *FEMS Microbiology Ecology.* **34**: 255-266.
- Leclerc, M. (1996) Humoral factors in marine invertebrates. In: Rinkevich B, Muller WEG, editors. Invertebrate immunology. Berlin: Springer Verlag. p 1-10.
- Lee, W. and Park, Y. (1998) Isolation of marine bacteria killing red tide micro-algae: 2. Isolation and algicidal properties of *Pseudomonas* sp. LG-2 possessing killing activity for dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. *J Korean Fish Soc.* **31**: 852-858.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. and Poirier, F. (2002) Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal.* **19**: 433-440.
- Leppa, S. and Bohmann, D. (1999) Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene.* **18**: 6158-6162.
- Lessman, C. (1998) Oogenesis in nonmammalian vertebrates. In Encyclopedia of reproduction. Eds. Knobil, E., Neill, J.D. Academic press, San Diego: 498-508.

Levashina, E.A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.-M. (1999) Constitutive Activation of Toll-Mediated Antifungal Defense in Serpin-Deficient Drosophila. *Science*. **285**: 1917-1919.

Levy, O. (2000) A Neutrophil-Derived Anti-Infective Molecule: Bactericidal/Permeability-Increasing protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2925-2931.

Levy, F., Bulet, P. and Ehret-Sabatier, L. (2004) Proteomic Analysis of the Systemic Immune Response of Drosophila. *Mol Cell Proteomics*. **3**: 156-166.

Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K. and O'Neill, L.A.J. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature*. **5**: 446-458.

Lijima, R., Kisugi, J. and Yamazaki, M. (1995) Antifungal activity of Aplysianin E, A cytotoxic protein of sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. *Developmental & Comparative Immunology*. **19**: 13-19.

Lillie, F.R. (1895) The embryology of the Unionidae. *J. Morph.* **10**: 1-100.

Lindquist, N., Hay, M.E. and Fenical, W. (1992) Defence of ascidians and their conspicuous larvae: adult vs. larval chemical defences. *Ecological Monographs*. **62**: 547-568.

Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C.P. and Toranzo, A.E. (1987) Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*. **65**: 15-29.

Lucas, J.S., Hart, R.J., Howden, M.E. and Salathe, R. (1979) Saponins in eggs and larvae of *Acanthaster planci* (L.) (Asteroidea) as chemical defences against planktivorous fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **40**: 155-165.

Luna-González, A., Maeda-Martínez, A., Sainz, J. and Ascencio-Valle, F. (2002) Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis Aquat Organ*. **49**: 221-226.

Luna-Gonzalez, A., Maeda-Martinez, A., Ascencio-Valle, F. and Robles-Mungaray, M. (2004) Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*. **16**: 287-294.

Lymbery, A. (2000) Genetic improvement in the Australian aquaculture industry. *Aquacult. Res.* **31**: 145-149.

**-M-**

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**: 345-349.

Mahon, G.A.T. (1983) Selection goals in oyster breeding. *Aquaculture*. **33**.

Martin, G., Poole, D., Poole, C., Hose, J., Arias, M., Reynolds, L., *et al* (1993) Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *J. Invert. Pathol.* **62**: 308-315.

- Mathey-Prevot, B. and Perrimon, N. (1998) Mammalian and Drosophila Blood: JAK of All Trades? *Cell*. **92**: 697-700.
- 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **145**: 325-330.
- Maurer, D. and Comps, M. (1986) Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. In : Pathology in Marine Aquaculture. Vivarès C.P., Bonami J.R. and Jaspers E. (Ed.), European Aquaculture Society, Special Publication N° 9, Bredene, Belgium, pp 29-41.
- Maurer, D., Comps, M. and His, E. (1986) Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis*. **15**: 309-317.
- McCord, J.M. and Edeas, M.A. (2005) SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **59**: 139-142.
- McCormick-Ray, M. and Howard, T. (1991) Morphology and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal variations. *J Invertebr Pathol*. **58**: 219-230.
- McHenery, J.G. and Birkbeck, T.H. (1986) Inhibition of filtration in *Mytilus edulis* L. by marine vibrios. *J. Fish Dis*. **9**: 257-261.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A. (1997) Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*. **91**: 295-298.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A. (1998) An ancient system of host defense. *Current Opinion in Immunology*. **10**: 12-15.
- Meyers, B.C., Morgante, M. and Michelmore, R.W. (2002) TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. *The Plant Journal*. **32**: 77-92.
- Mialhe, E., Bachere, E., Boulo, V., Cadoret, J., Rousseau, C., Cedeno, V., *et al* (1995) Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. **4**: 275-283.
- Miranda, C.D. and Zemelman, R. (2001) Antibiotic Resistant Bacteria in Fish from the Concepcion Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin*. **42**: 1096-1102.
- 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**: 71-78.
- 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**: 4233-4242.

- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noel, T., Romestand, B., Beauvillain, J., Salzet, M. and Roch, P. (2000a) Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J Cell Sci.* **113**: 2759-2769.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M. and Roch, P. (2000b) Involvement of Mytilins in Mussel Antimicrobial Defense. *J. Biol. Chem.* **275**: 12954-12962.
- Mitta, G., Galinier, R., Tisseyre, P., Allienne, J.-F., Girerd-Chambaz, Y., Guillou, F., *et al* (2005) Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology.* **29**: 393-407.
- Mix, M.C. (1976) A general model for leucocytes renewal in bivalve mollusks. *Mar. Fisher. Rev.* **38**: 37-41.
- Miyake, K. (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* **12**: 186-192.
- Mon, K., Muramaya, K., Kanna, N. and Nakumura, M. (1984) Occurrence and characterization of the defence factors in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural Research.* **35**: 55-61.
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F. and Escoubas, J.-M. (2001) Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Letters.* **500**: 64-70.
- Montagnani, C. (2002) Immunité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: Caractérisation d'un inhibiteur de métalloprotéase & de facteurs de la voie de signalisation Rel/NF-kB. Thèse de doctorat. Université Pierre & Marie Curie, 268 p.
- Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M. and Escoubas, J.M. (2004) Cg-Rel, the first Rel/NF- $\kappa$ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters.* **561**: 75-82.
- Montagnani, C., Tirapé, A., Boulo, V. and Escoubas, J.M. (2005) The two Cg-timp mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis. *Developmental & Comparative Immunology.* **29**: 831-839.
- 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. *Developmental & Comparative Immunology.* **31**: 1-11.
- Montes, J.F., Durfort, M. and Garcia-Valero, J. (1995) Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell Tissue Research.* **279**: 529-538.
- Moor, B. (1983) Organogenesis. In: The Mollusca (K.M. Wilbur, ed), Development. (N.H. Verdunk, J.A.M. Van den Biggelaar & A.S. Tompa, eds), *Academic Press, New York.* **3**: 122-177.

Moore, C. and Gelder, S. (1985) Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Trans. Am. Micros. Soc.* **104**: 242-249.

Moore, M.N. and Lowe, D.M. (1977) The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *Journal of Invertebrate Pathology.* **29**: 18-30.

Morisato, D. and Anderson, K. (1995) Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 371-399.

Mouêza, M., Gros, O. and Frenkiel, L. (1999) Embryonic, Larval and Postlarval Development of the Tropical Clam, *Anomalocardia Brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). *J. Mollus. Stud.* **65**: 73-88.

Mourton, C., Boulo, V., Chagot, D., Hervio, D., Bachere, E., Mialhe, E. and Grizel, H. (1992) Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): in vitro system establishment. *Journal of Invertebrate Pathology.* **59**: 235-240.

Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D. and Bachère, E. (2002) Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimps. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2678-2689.

-N-

Naciri-Graven, Y., Martin, A.G., Baud, J.P., Renault, T. and 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.

Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **274**: 21491-21494.

Nell, J.A., Smith, I.R. and Sheridan, A.K. (1999) Third generation evaluation of Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) breeding lines. *Aquaculture.* **170**: 195-203.

Nicolas, J.L., Comps, M. and Cochenec, N. (1992) Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **12**: 11-13.

Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. and Ansquer, D. (1996) Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis Aquat Organ.* **27**: 67-76.

Nicolas, J.-L., Corre, S. and Cochard, J.-C. (2004) Bacterial Population Association with Phytoplankton Cultured in a Bivalve Hatchery. *Microbial Ecology.* **48**: 400-413.

Nottage, S.A. and Birkbeck, T.H. (1987) Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* L. larvae with *Vibrio alginolyticus* NCMB and the antigenic relationship between proteinases produced by marine vibrios pathogenic for fish and shellfish. *J. Fish Dis.* **10**: 265-273.

Nottage, S.A., Sinclair, P.D. and Birkbeck, T.H. (1989) Role of low-molecular-weight ciliostatic toxins in vibriosis of bivalve mollusks. *J. Aquat. An. Health.* **1**: 180-186.

**-O-**

Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I. and Peault, B. (2002) Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development.* **129**: 4147-4157.

Ohno, N. and Morrison, D. (1989) Lipopolysaccharide interactions with lysozyme differentially affect lipopolysaccharide immunostimulatory activity. *Eur J Biochem.* **186**: 629-636.

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. *Developmental & Comparative Immunology.* **16**: 123-138.

Olsen, O.M., Nilsen, I.W., Sletten, K. and Myrnes, B. (2003) Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* **136**: 107-115.

Oren, M., Douek, J., Fishelson, Z. and Rinkevich, B. Identification of immune-relevant genes in histoincompatible rejecting colonies of the tunicate *Botryllus schlosseri*. *Developmental & Comparative Immunology.* **In Press.**

Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V. and Torti, F.M. (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem. J.* **357**: 241-247.

**-P-**

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

Panicker, G., Call, D.R., Krug, M.J. and Bej, A.K. (2004) Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7436-7444.

Park, Y., Park, J., Chung, S., Song, B., Lee, W., Lim, W. and Kim, C. (1998) Isolation of marine bacteria killing red tide micro-algae: 1. Isolation and algicidal properties of *Micrococcus* sp. LG-1 possessing killing activity for harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *J Korean Fish Soc.* **31**: 767-773.

Peterson, K., Lyons, J., Nowak, K., Takacs, C., Wargo, M. and McPeck, M. (2004) Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proc Natl Acad Sci.* **101**: 6536-6541.

Picton, H.M. and Gosden, R.G. (1999) Oogenesis in mammals. In: Encyclopedia of reproduction. Eds. Knobil, E., Neill, J.D. Academic press, San Diego: 489-497.



Pietrella, D., Cherniak, R., Strappini, C., Perito, S., Mosci, P., Bistoni, F. and Vecchiarelli, A. (2001) Role of Mannoprotein in Induction and Regulation of Immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **69**: 2808-2814.

Pipe, R. (1990) Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research.* **261**: 261-268.

Pitzurra, L., Cherniak, R., Giammarioli, M., Perito, S., Bistoni, F. and Vecchiarelli, A. (2000) Early Induction of Interleukin-12 by Human Monocytes Exposed to *Cryptococcus neoformans* Mannoproteins. *Infect. Immun.* **68**: 558-563.

Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W. and Orkin, S.H. (1996) The T Cell Leukemia Oncoprotein SCL/tal-1 Is Essential for Development of All Hematopoietic Lineages. *Cell.* **86**: 47-57.

Prieur, D. (1976) Etude de bacteries associees aux elevages de larves de bivalves marins Study of bacteria associated with the rearing of larvae of marine bivalves. *Aquaculture.* **8**: 225-240.

Prieur, D. (1981) Les relations entre mollusques bivalves et bacteries hétérotrophes en milieu marin. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, pp. 65-80.

Prieur, D. (1982) La microflore du tractus digestif des bivalves marins. Étude expérimentale chez la moule, *Mytilus edulis*. *Malacologia.* **22**: 653-658.

Prieur, D. (1987) A review of the relationships between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Symbiosis.* **4**: 37-50.

Prieur, G., Mevel, G., Nicolas, J., Plusquellec, A. and Vigneulle, M. (1990) Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev.* **28**: 277-352.

Prothmann, C., Armstrong, N.J. and Rupp, R.A.W. (2000) The Toll/IL-1 receptor binding protein MyD88 is required for *Xenopus* axis formation. *Mechanisms of Development.* **97**: 85-92.

**-R-**

Rabinovich, G. and Gruppi, A. (2005) Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunology.* **27**: 103-114.

Ranson, G. (1948) Prodissoconques et classification des ostréides vivants. *Bulletin du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique.* **24**: 1-12.

Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P. (1985) Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology.* **97**: 183-350.

Ray, S.M. (1966) Effects of various antibiotics on the fungus *Dermocystidium marinum* in thioglycollate cultures of oyster tissues. *Journal of Invertebrate Pathology.* **8**: 433-438.

- Renault, T. and Cochenec, N. (1994) Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **64**: 160-162.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R. and Chollet, B. (1994a) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. **14**: 64-66.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N. and Maffart, P. (1994b) Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-comparative study. *Revue Médicale Vétérinaire*. **145**: 735-742.
- Renault, T. and Cochenec, N. (1995) Chlamydia-like organisms in ctenidia mantle cells off the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms*. **23**: 153-159.
- Renault, T., Le Deuff, R., Cochenec, N., Chollet, B. and Maffart, P. (1995) Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.* **26**: 539-543.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Lipart, C. and Delsert, C. (2000a) Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods*. **88**: 41-50.
- Renault, T., Stokes, N.A., Chollet, B., Cochenec, N., Berthe, F., Gérard, A. and Burreson, E.M. (2000b) Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms*. **42**: 207-214.
- Renault, T. and Novoa, B. (2004) Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* **17**: 397-409.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M. and Ishida, Y. (1996) Isolation of a native bacterial strain from the scallop, *Argopecten purpuratus*, with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Res.* **15**: 369-374.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. and Candia, M. (1997) Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*. **154**: 17-26.
- Riquelme, C., Araya, R. and Escribano, R. (2000) Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*. **181**: 25-36.
- Riquelme, C., Jorquera, M., Rojas, A., Avendaño-Herrera, R. and Reyes, N. (2001) Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*. **192**: 11-119.
- Rodrick, G.E. and Cheng, T.C. (1974) Kinetic properties of lysozyme from the hemolymph of *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **24**: 41-48.

Rodriguez, A., Cuesta, A., Ortuno, J., Esteban, M.A. and Meseguer, J. (2003) Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **96**: 183-192.

Ruiz, C.M., Roman, G. and Sanchez, J.L. (1996) A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. *Aquaculture International*. **4**: 289-291.

Ruiz-Ponte, C., Samain, J.F., Sanchez, J.L. and Nicolas, J.L. (1999) The Benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology*. **1**: 52-59.

-S-

Saavedra, C. and Bachère, E. (2006) Bivalve genomics. *Aquaculture*. **256**: 1-14.

Samain, J.F., Boudry, P., Degremont, L., Soletchnik, P., Ropert, M., Bedier, E., *et al* (2004a) Summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of 3-year results of the cooperative "MOREST" Project. *Journal of Shellfish Research*. **23**: 309-310.

Samain, J.F., Boudry, P., Degremont, L., Soletchnik, P., Ropert, M., Bedier, E., *et al* (2004b) The programme Morest Summer mortality of *Crassostrea gigas* oyster Plouzane (France), Ifremer. 23-30. *Actes de colloques. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer [in Styli 2003 Actes Colloq.38 IFREMER]. 2004. p.23-30.*

Samain, J.F., Dégremon, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., *et al* Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *In Press*.

Samanta, M.P., Tongprasit, W., Istrail, S., Cameron, R.A., Tu, Q., Davidson, E.H. and Stolc, V. (2006) The Transcriptome of the Sea Urchin Embryo. *Science*. **314**: 960-962.

Sasamura, T., Kobayashi, T., Kojima, S., Qadota, H., Ohya, Y., Masai, I. and Hotta, Y. (1997) Molecular cloning and characterization of *Drosophila* genes encoding small GTPases of the rab and rho families. *Mol. Gen Genet*. **254**: 486-494.

Sato, S., Ouellet, N., Pelletier, I., Simard, M., Rancourt, A. and Bergeron, M. (2002) Role of Galectin-3 as an Adhesion Molecule for Neutrophil Extravasation During Streptococcal Pneumonia. *J Immunol*. **168**: 1813-1822.

Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I. and Larsen, J.L. (2001) Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl. Environ. Microbiol*. **67**: 5675-5682.

Senger, K., Armstrong, G.W., Rowell, W.J., Kwan, J.M., Markstein, M. and Levine, M. (2004) Immunity Regulatory DNAs Share Common Organizational Features in *Drosophila*. *Molecular Cell*. **13**: 19-32.

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**: 1998-2004.

Sequeira, T., Tavares, D. and Arala-Chaves, M. (1996) Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol.* **20**: 97-104.

Shapiro, R., Cunningham, M., Ratcliffe, K., Seachord, C., Blake, J., Bajorath, J., *et al* (1997) Identification of CD14 residues involved in specific lipopolysaccharide recognition. *Infect Immun.* **65**: 293-297.

Shibata, Y., Metzger, W. and Myrvik, Q. (1997) Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan. *J. Immunol.* **159**: 2462-2467.

Shivdasani, R., Mayer, E. and Orkin, S. (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL. *Nature.* **373**: 432-434.

Sholz, A., Westley, R. and Tarr, M. (1973) Pacific oyster mass mortality studies; seasonal summary. *Report n°4. Washington Departement of Fisheries*: 30 p.

Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., *et al* (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* **276**: 33293-33296.

Simkiss, K., Taylor, M. and Mason, A. (1982) Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Mar. Biotechnol. Lett.* **3**: 187-201.

Sindermann, C.J. (1990) Diseases of Marine Shellfish. Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Academic Press, San Diego.

Singleton, P. and Sainsbury, D. (1991) Dictionary of microbiology and molecular biology. John Wiley and Sons Ltd, Second edition, 1019 p.

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**: 4670-4678.

Sminia, T. and van der Knaap, W. (1987) Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev Comp Immunol.* **11**: 17-28.

Smolowitz, R., Leavitt, D. and Perkins, F. (1998) Observations of a Protistan Disease Similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (Hard Clams) from the Coast of Massachusetts. *J Invertebr Pathol.* **71**: 9-25.

Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology.* **10**: 23-28.

- Söderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S. and Soderhall, K. (2003) Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental & Comparative Immunology*. **27**: 661-672.
- Söderhäll, I., Kim, Y.-A., Jiravanichpaisal, P., Lee, S.-Y. and Soderhall, K. (2005) An Ancient Role for a Prokineticin Domain in Invertebrate Hematopoiesis *J Immunol*. **174**: 6153-6160.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P. and Gouletquer, P. (1999) Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron : étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquat. Living Resour.* **12**: 131-143.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Dégremont, L., Bédier, E., *et al* (2003) Characterization of summer mortalities of *C. gigas* in France relation to environmental parameters. *J. Shellfish Res.* **22**: 354.
- Soletchnik, P., Lambert, C. and Costil, K. (2005) Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to rearing environment conditions. *J Shellfish Res.* **24**: 197-207.
- Sonnenberg, A. (1993) Integrins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*. **184**: 7-35.
- Stabili, L., Licciano, M. and Pagliara, P. (1994) Evidence of antibacterial and lysozyme-like activity in different planktonic larval stages of *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*. **119**: 501-505.
- Stafford, J. (1905) On the larva and spat of the Canadian oyster. *Amer. Nat.* **39**: 41-44.
- Sterrer, W. (1974) Gnathostomulida. In Giese, A. C. & J. S. Pearse (eds), *Reproduction of Marine Invertebrates. Academic Press, New York*. **1**: 345-357.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. and Muroga, K. (1998) *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ.* **33**: 111-118.
- Suminto and Hirayama, K. (1997) Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae. *Hydrobiologia*. **358**: 223-230.
- Suphantharika, M., Khunrae, P., Thanardkit, P. and Verduyn, C. (2003) Preparation of spent brewer's yeast [beta]-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresource Technology*. **88**: 55-60.
- Suzuki, K., Okawa, Y., Hashimoto, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1984) Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol. Immunol.* **28**: 903-912.
- Suzuki, T., Hashimoto, S., Toyoda, N., Nagai, S., Yamazaki, N., Dong, H.-Y., *et al* (2000) Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood*. **96**: 2584-2591.

**-T-**

Takahashi, K.G., Nakamura, A. and Mori, K. (2000) Inhibitory Effects of Ovoglobulins on Bacillary Necrosis in Larvae of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **75**: 212-217.

Takahashi, Y., Maeda, M., Watanabe, R., Uehara, K., Itami, T., Hennig, O. and Ishahara, S. (2001) Yeast cell wall improves biophylaxis ability. *Asian Aquacul. Mag.* September/October: 28-29.

Takano, T., Kondo, H., Hirono, I., Saito-Taki, T., Endo, M. and Aoki, T. (2006) Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Developmental & Comparative Immunology*. **30**: 807-816.

Takeda, K. and Akira, S. (2001) Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *1: J Infect Dis.* **2001**. **54**: 209-219.

Takemoto, Y., Furuta, M., Li, X., Strong-Sparks, W. and Hashimoto, Y. (1995) LckBP1, a proline-rich protein expressed in haematopoietic lineage cells, directly associates with the SH3 domain of protein tyrosine kinase p56lck. *EMBO J.* **14**: 3403-3414.

Tan, N.S., HO, B. and Ding, J.L. (2000) High-affinity LPS binding domain(s) in recombinant factor C of a horseshoe crab neutralizes LPS-induced lethality. *FASEB J.* **14**: 859-870.

Tanaka, K., Takasugi, T. and Maoka, H. (1961) Morphological characteristics of the blood corpuscles of the common oyster, *Gryphea gigas*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **27**: 365-371.

Tanguy, A., Boutet, I., Riso, R., Boudry, P., Auffret, M. and Moraga, D. (2003) Metallothionein genes in the European flat oyster *Ostrea edulis*: a potential ecological tool for environmental monitoring? *Mar Ecol Prog Ser.* **257**: 87-97.

Tanguy, A., Guo, X. 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**: 121-131.

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

Teh, C., Le, Y., Lee, S. and Lu, J. (2000) M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl- d-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunology.* **101**: 225-232.

Terai, I., Kobayashi, K., Matsushita, M. and Fujita, T. (1997) Human serum mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1): determination of levels in body fluids and identification of two forms in serum. *Clin Exp Immunol.* **110**: 317-323.

Thanardkit, P., Khunrae, P., Suphantharika, M. and Verduyn, C. (2002) Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **18**: 527-539.

Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandembulcke, F. and Boulo, V. (2007) Expression of immune-related genes in the Oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev Comp Immunol*. **In Press**.

Torreilles, J., Guerin, M. and Roch, P. (1997) Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*. **21**: 267-275.

**-V-**

Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H. and O'Leary, N. (1999) C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol*. **23**: 401-420.

Verdonk, N.H. and van den Biggelaar, J.A.M. (1983) Early development and the formation of the germ layers. In Verdonk, N. H., J. A. M. van den Biggelaar & A. S. Tompa (eds), *The Mollusca*. Academic Press, New York: 91-122.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. (2000a) Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 655-671.

Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. (2000b) Selected Bacterial Strains Protect *Artemia* spp. from the Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1139-1146.

Vierstraete, E., Verleyen, P., Baggerman, G., D'Hertog, W., Van den Bergh, G., Arckens, L., *et al* (2004) From the Cover: A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *PNAS*. **101**: 470-475.

**-W-**

Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E. and Berthe, F. (2002) Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *C R Biol.* **325**: 231-238.

Wajant, H., Muhlenbeck, F. and Scheurich, P. (1998) Identification of a TRAF (TNF Receptor-Associated Factor) Gene in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Evolution*. **47**: 656-662.

Waller, T.R. (1981) Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linne. *Smithsonian Contrib. Zool.* **328**: 1-70.

Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I. and Odeberg, H. (1978) Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **253**: 2664-2672.

Weiss, J. (2003) Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 785-790.

Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z. (1997) MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity*. **7**: 837-847.

White, K.N. and Ratcliffe, N.A. (1982) The segregation and elimination of radio- and fluorescent-labelled marine bacteria from the haemolymph of the shore crab, *Carcinus maenas*. *J. Mar. Biol.* **62**: 819-833.

Wootton, E., Dyrinda, E. and Ratcliffe, N. (2006) Interaction between non-specific electrostatic forces and humoral factors in haemocyte attachment and encapsulation in the edible cockle, *Cerastoderma edule*. *J Exp Biol.* **209**: 1326-1335.

**-X-**

Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J.L. and Tong, L. (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*. **408**: 111-115.

Xue, Q. (1998) Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, 324 p.

Xue, Q. and Renault, T. (2000) Enzymatic Activities in European Flat Oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*. **76**: 155-163.

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. *Developmental & Comparative Immunology*. **25**: 187-194.

Xue, Q.G., Renault, T. and Chilmonczyk, 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. and La Peyre, J.F. (2004) Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **139**: 11-25.

**-Y-**

Yadoma, T. and Ohno, N. (1996) Structure-activity relationship of immunomodulating(1-3)- $\beta$ -D-glucan. *Recent Results Dev Chem Pharm Sci.* **1**: 23-33.

Yamaoka, A., Kuwabara, I., Frigeri, L. and Liu, F. (1995) A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol.* **154**: 3479-3487.

Young, C.M., Vazquez, E., Metaxas, A. and Tyler, P.A. (1996) Embryology of vestimentiferan tube worms from deep-sea methane/sulphide seeps. *Nature*. **381**: 514-516.



**-Z-**

Zhang, Y., Meng, Q., Jiang, T., Wang, H., Xie, L. and Zhang, R. (2003) A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **135**: 43-54.