



N° ORDRE : 3884



## **THESE**

UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES I**

Mention : Biologie

Soutenue le 26 février 2009

par

**Elodie FLEURY**

Equipe d'accueil : Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, IFREMER Brest

Ecole doctorale : Vie-Agro-Santé

**EXPLORATION FONCTIONNELLE DE GENES  
DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMES ENTRE LES SOUCHES  
D'HUITRES CREUSES *CRASSOSTREA GIGAS*  
RESISTANTES ET SENSIBLES A LA MORTALITE ESTIVALE**

### **COMPOSITION DU JURY :**

M. KLOAREG Bernard – Professeur à l'Université de Paris VI

M. PANSEARAT Stéphane – Chercheur INRA à St Pée-sur Nivelle

M. LAREYRE Jean-Jacques – Chercheur INRA à Rennes

M. BOUJARD Daniel – Professeur à l'Université de Rennes 1

M. FAVREL Pascal – Professeur à l'Université de Caen

M. HUVET Arnaud – Chercheur IFREMER à Brest

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Co-directeur de thèse

Directeur de thèse







## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés du centre IFREMER de Brest, associé au Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines de l'Université de Caen, dans le cadre de l'Unité Mixte de Recherche « Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins ». Je remercie les directeurs respectifs de ces laboratoires, Jean-Louis Nicolas directeur du LPI, et Michel Mathieu, directeur de l'UMR PE2M, qui m'ont accueillie dans leurs équipes.

Durant ces 3 années de thèse, j'ai pu bénéficier d'un financement, et c'est pourquoi je tiens à remercier l'IFREMER et la région Basse Normandie. Je remercie également l'école doctorale Vie Agro Santé de l'Université de Rennes I, qui m'a accordée l'équivalence de DEA après mon diplôme d'ingénieur, me permettant ainsi de m'inscrire au sein de cette école doctorale et de réaliser ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à Bernard Kloareg et Stéphane Pansérat qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier chaleureusement Jean-Jacques Lareyre et Daniel Boujard pour leur participation à ce jury. Merci également à Pascal Favrel, co-directeur de cette thèse, pour son encadrement et ses conseils avisés.

Je tiens à remercier très chaleureusement Jean-François Samain qui a encadré ma première année de thèse avant son départ à la retraite, et qui m'a transmis sa passion, son enthousiasme. Il continue à veiller sur les mortalités estivales comme personne, et ce fut un plaisir de pouvoir travailler à ses côtés.

Il n'est pas facile de trouver les mots pour remercier comme il se doit mon directeur de thèse, Arnaud Huvet. En plus d'être un « chef » exceptionnel, il a su faire de cette thèse un véritable moment de bonheur, en étant toujours présent, en me faisant toujours confiance, et en sachant me guider dans tous les moments importants. J'ai eu la chance de découvrir en lui un véritable « grand frère », avec une complicité que je n'aurai jamais pensé trouver ... et il ne va vraiment pas être évident d'apprendre à voler sans lui ! Je projette d'ailleurs de continuer à l'embêter un tout petit peu ...

Le lien est tout trouvé pour remercier Caroline Fabioux, qui a été présente du début jusqu'à la fin de cette thèse. Avec une bonne humeur et un enthousiasme constants, elle a toujours été disponible pour m'aider, que ce soit pour me donner tous les filons de l'hybridation in situ, ou pour m'apprendre à distinguer un poireau d'un concombre (il y a malheureusement encore beaucoup de travail de ce côté là, cela me fera une excuse pour continuer à savourer sa délicieuse cuisine !) Mais l'aventure n'est pas finie !.

Merci à Jeanne Moal qui a toujours veillé sur mes travaux et qui m'a donnée de nombreux conseils. Ce fut un réel plaisir de travail à ses côtés, autant d'un point de vue personnel que professionnel. Merci également à Jean-Yves Daniel, pour toute sa rigueur, pour tout son investissement dans ce travail ... et merci également pour les délicieuses galettes des rois ! Merci aussi à toi, Guilou, pour ton travail, ta bonne humeur, et tes nombreuses péripéties, qui me laissent toujours sans voix ! keep cool !

Elle est arrivée tard, mais comment l'oublier ?! Merci à Charlotte Corporeau (dite Cha pour les intimes) qui est arrivée avec son énergie, son punch naturel et toutes ses compétences dans notre laboratoire en 2008. J'espère que la manip « Cha-Elo » anti-libido portera ses fruits, mais ce fut déjà un réel plaisir que de « piquer les gonades » en sa compagnie ... Je remercie également Pierre Boudry, qui portera toujours en lui le savoir de la génétique, et les « bonnes tournures de phrase » pour faire passer un message de la façon la plus claire possible.

Un « intrus » parmi toutes ces huîtres, MON poisson David Mazurais, qui a été d'un soutien inconditionnel pendant tout ce temps. Toujours présent pour me remotiver lors de mes petits coups de mou, il a aussi su me donner de nombreux conseils et me présenter les bonnes personnes (je pense évidemment à Alain Hénaut !). Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait, et espère bien pouvoir un jour résoudre ton problème d'hypo-lavandite ..

Je tiens également à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à tous les membres du LPI, sans qui ce travail n'aurait jamais été aussi agréable. Merci à vous, Philippe et Claudie, pour nos pauses philosophiques et « tabagiques » sur le balcon, merci à Véro de ne pas avoir perdu tous ses cheveux pour mes missions aux Etats-Unis, merci à Catherine à Jean-René pour les récits de bateau. Je n'oublie évidemment pas mes premières « petites » stagiaires, qui j'espère n'ont pas trop souffert, Rozenn et Jeanne : merci les miss, je vous souhaite tout plein de bonnes choses pour la suite !

Je pense aussi à mes amis Brestois, sans qui la vie ne serait pas aussi jolie : ma petite Marinette et son goût inné pour les cadeaux qui mettent à l'aise, la belle Hélène et nos voltiges autour du fort de Berthaume, Clément et son exquis tiramisu au kiwi, Vincent et notre super périple à la Baule, Yannick et les tonQ PariMatch, Yves et les soirées à La Rochelle, Rossanna et les R qui roulent, Doudou et sa « cool attitude », Loac et les évasions en mer ... Merci aux hommes de la fin : Eric, Massimo et Julien ... Bon courage JuJu pour la dernière ligne droite, n'oublies pas d'illustrer ta thèse avec tes fabuleux dessins !

J'ai eu le bonheur de faire mes premiers pas à l'IFREMER en Polynésie aux côtés de Nathalie Cochennec qui a su me transmettre sa passion et son enthousiasme. Depuis, travailler à l'IFREMER était pour moi un rêve qui s'est réalisé au cours de cette thèse et je continuerai de collectionner tout ce qui porte le nom de cet institut (même les sacs plastiques !). J'ai ainsi eu la chance de pouvoir concilier le travail avec une véritable passion : le monde marin ...

Enfin, je dédie tout ce travail à ma famille. Merci Mimi pour tes messages et tes petites attentions, merci p'tit grand frère pour ton humour et tes bonnes ondes japonaises ...

Et surtout merci à mes parents, qui ont toujours été là, depuis mes premiers pas de danseuse jusqu'à ce jour de soutenance (inoubliable !). Vous m'avez toujours fait confiance, vous m'avez toujours confortée dans tous mes choix, et je me rends compte aujourd'hui que c'est une chance extraordinaire ...

A Papou, A Mamée ...



# Tables des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>1. Les maladies multifactorielles : définition</b>	<b>3</b>
<b>2. L'interaction de plusieurs facteurs</b>	<b>6</b>
2.1 Un exemple chez l'humain : la sclérose en plaques	6
2.2 Un exemple chez les abeilles : l'effondrement des colonies	8
2.3 Un exemple chez les gorgones et les éponges : la mortalité de 1999	10
2.4 Un exemple chez la moule : les mortalités estivales	13
2.5 Un exemple chez l'huître creuse : les mortalités estivales	15
<b>Contexte de l'étude &amp; objectifs</b>	<b>19</b>
<b>1. Présentation du modèle biologique</b>	<b>21</b>
1.1 L'ostréiculture, histoire et enjeux actuels	21
1.2 Systématique et répartition	22
1.2 Ecologie et biologie	24
1.3 Reproduction	26
1.4 Développement	30
1.5 Nutrition de l'huître	31
1.6 Gestion des réserves énergétiques	32
1.7 Le système immunitaire	33
<b>2. Les mortalités estivales : une interaction entre l'environnement, les pathogènes et l'huître</b>	<b>37</b>
2.1 Les risques liés à l'environnement	37
2.2 Les risques liés aux pathogènes	44
2.3 Les risques liés à l'hôte	49
<b>3. Problématique, objectifs et moyens</b>	<b>66</b>
3.1 La problématique	66
3.2 Les objectifs	66
3.3 Les moyens	67
<b>Premier chapitre : Génération et analyse d'un grand nombre d'ESTs chez <i>Crassostrea gigas</i></b>	<b>70</b>
<b>1. Présentation générale et résumé de l'article</b>	<b>72</b>
<b>2. Article n°1</b>	<b>83</b>

<b>Deuxième chapitre : Comparaison transcriptomique des lignées Résistantes et Sensibles par puce à ADN</b>	<b>118</b>
<b>1. Présentation générale et résumé de l'article</b>	<b>120</b>
1.1 Les approches transcriptomiques par puce à ADN	121
1.2 Application à la problématique des mortalités estivales	125
<b>2. Article n°2</b>	<b>135</b>
<b>Troisième chapitre : Analyses physiologiques d'un gène candidat : le gène <i>oyster-TGFβ-like</i></b>	<b>164</b>
<b>1. Présentation générale et résumé de l'article</b>	<b>166</b>
1.1 La superfamille des TGFβ	166
1.2 Les TGFβ impliqués dans la reproduction	169
1.3 L'identification d'un nouveau membre de la super-famille des TGFβ chez <i>Crassostrea. gigas</i>	172
<b>2. Article n°3</b>	<b>179</b>
<b>Quatrième chapitre : conclusion et perspectives</b>	<b>191</b>
<b>1. L'effort de production d'ESTs chez <i>C. gigas</i></b>	<b>193</b>
<b>2. La comparaison transcriptomique des lignées R et S</b>	<b>197</b>
2.1 Le choix des plans expérimentaux	197
2.2 L'identification de marqueurs moléculaires du caractère sélectionné : la résistance aux mortalités estivales	199
2.3 Les mortalités estivales : quels sont les processus biologiques suspectés d'être affectés ?	202
<b>3. Le gène <i>og-TGFβ-like</i> : un gène « coupable » dans les mortalités estivales ?</b>	<b>207</b>
<b>Annexes</b>	<b>210</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>220</b>
<b>Liste des figures et tableaux</b>	<b>245</b>

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AEC	Charge énergétique adénylique
AMH	Anti-müllerian hormone
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPC	AMP cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Bone Morphogenic Protein
C-terminale	Carboxy-terminale
CDD	Colony Collapse Disorder
CEA	Charge énergétique adénylique
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DIG	Digoxygénine
DNase	Désoxyribonucléase
ECP	Extra cellular product
EF I	Facteur d'élongation I
eQTL	expressed Quantitative Trait Loci
EST	Expressed Sequence Tag
ETS	Système de transport d'électrons
FAO	Food and aquaculture organization
FDR	False Discovery Rate
GDF	Growth and Differentiation Factors
GP	Glycogène phosphorylase
G6P	Glycogène-6-phosphate
GS	Glycogène synthase
GSDF	Gonadal-Soma-derived growth factor
GST	Glutathion-s-transférase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HIS	Hybridation <i>in situ</i>

HK	Hexokinase
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSP	Heat shock proteins
IAPV	Israeli Acute Paralysis Virus
IκB	Inhibitor of NF-κB
JOD	Juvenile Oyster Disease
LPS	Lipopolysaccharide
MOREST	Mortalités estivales de <i>C. gigas</i>
MPSS	Massive Parallel Signature Sequencing
Mast	Microsatellite <i>in silico</i>
MT	Metallothionéines
NF-κB	Nuclear-Factor-κB
NPY	Neuropeptide Y
NPYr	Recepteur au NPY
N-terminale	Amino-terminale
<i>og-TGFβ-like</i>	<i>oyster-gonadal-TGFβ-like</i>
OH	Radical hydroxyle
ORF	Open reading frame
OsHV1	Ostreid Herpes Virus 1
Pb	Paires de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvate kinase
PGM	Phosphoglucomutase
PK	Pyruvate kinase
QTL	Quantitative Trait Loci
R	Huîtres Résistantes
REPAMO	Réseau de Pathologie des Mollusques
RLO	Radicaux libres oxygénés
RNAi	RNA interference
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse-transcription PCR
S	Huîtres Sensibles
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression

SEP	Sclérose en plaques
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD	Superoxide dismutase
SSH	Suppressive subtraction hybridization
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
UTR	Untranslated region



---

# Introduction générale

---



## 1. Les maladies multifactorielles : définition

Les maladies, au sens général du terme, se définissent comme une altération de la santé, affectant l'équilibre des être vivants. Il existe de nombreux facteurs pouvant entraîner l'apparition d'une maladie : ces facteurs peuvent être aussi bien intrinsèques qu'extrinsèques à l'organisme concerné. Ainsi, les affectations génétiques peuvent être considérées comme des facteurs intrinsèques, alors que l'exposition à l'environnement ou l'action de pathogènes représentent des facteurs extrinsèques. Cependant, la présence d'un facteur intrinsèque n'exclue pas celle d'un facteur extrinsèque, et inversement. Ainsi, de nombreuses maladies résultent de la combinaison de l'ensemble de ces facteurs, et l'on parle alors de maladies multifactorielles.

L'argument de poids pour affirmer que les maladies multifactorielles ont une composante génétique est l'existence de cas familiaux, avec plusieurs individus atteints de la maladie dans différentes générations. Le nombre de gènes impliqués dans chacune de ces maladies reste souvent incertain, pouvant être inférieur à 10 dans certaines, et de plusieurs dizaines dans d'autres. Cependant les facteurs génétiques n'interviennent pas seuls : des risques environnementaux interviennent également, et peuvent être très divers, comprenant par exemple l'alimentation, le stress, les chocs thermiques, les pollutions ... L'intervention d'agents pathogènes (virus, bactéries) peut également agir comme facteur « aggravant ». Les maladies multifactorielles résultent donc de l'interaction de l'ensemble de ces facteurs, selon le principe développé par Sniesko (1974) (Figure 1).

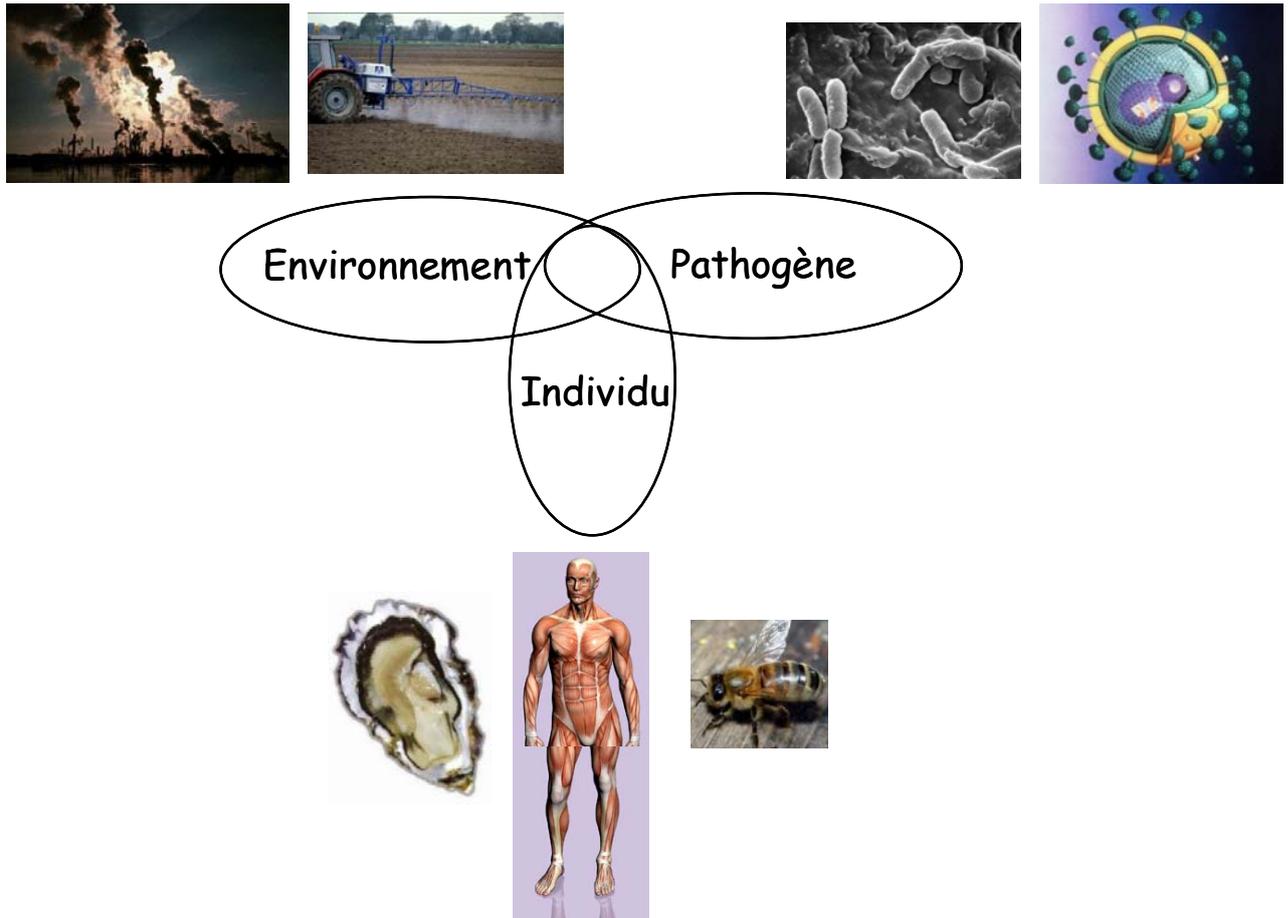


Figure 1 : Schéma des interactions Environnement-Pathogène-Individu  
(modifié d'après Sniesko, 1974).

Concernant les maladies multifactorielles, on parle donc de notion de « prédisposition » : la coexistence de plusieurs facteurs génétiques, pathogéniques et environnementaux indique que les gènes impliqués dans ces maladies doivent être considérés uniquement comme des gènes de vulnérabilité. Ainsi, avoir une mutation dans un ou plusieurs de ces gènes ne sera pas forcément associé à la maladie. C'est pourquoi dans les maladies multifactorielles, même si certains gènes de prédisposition ont été découverts, des tests génétiques ne seront pas systématiquement pratiqués dans le cadre d'un conseil génétique, car ils n'auront pas toujours une valeur diagnostique ou prédictive.

Ces critères permettent de différencier ces types de maladies des maladies monogéniques, dans lesquelles les mutations intervenantes sont directement la cause de la maladie (Tableau 1). Le mode de transmission des maladies multifactorielles ne répond pas aux lois de Mendel, le calcul du risque de réapparition de la maladie d'une génération à l'autre devant prendre en compte des facteurs extérieurs à la génétique proprement dite (Demenais *et al.*, 1996). Il n'y a ainsi pas de règles générales, chaque maladie ayant ses particularités, qui peuvent notamment être liées au nombre de gènes impliqués dans la maladie. Ainsi, on parlera de maladies multifactorielles pour des traits ou des maladies dans lesquels il existe une tendance familiale, mais dont la distribution n'est pas compatible avec une hérédité mendelienne.

<b>Maladie Mendelienne</b>	<b>Maladie Multifactorielle</b>
<p>Un seul gène impliqué</p> <p>Allèle pathologique Effet pathologique intrinsèque</p> <p>Effet majeur Isolé ou rupture d'une chaîne de causalité</p> <p>Nécessaire et suffisant</p> <p>Maladie rare parce que allèle pathologique rare</p> <p>Effet modéré de l'environnement</p>	<p>Plusieurs gènes impliqués</p> <p>Allèles de susceptibilité Effet pathologique dans un contexte</p> <p>Effet mineur Rupture locale ou modification d'un réseau de causalité</p> <p>Ni nécessaire, ni suffisant</p> <p>Maladie rare même si allèles de susceptibilité fréquents</p> <p>Effet important de l'environnement</p>

Tableau 1 : Différences de critères de description entre une maladie dite « Mendelienne » et une maladie dite « Multifactorielle ».

La recherche effectuée sur certains cas de maladies multifactorielles constitue aujourd'hui, et pour les prochaines décennies, l'un des défis majeurs de la recherche dans plusieurs secteurs. Les réponses aux questions posées ne seront possibles que par l'étude de

séquences des génomes, via leurs séquençages et l'annotation fonctionnelle des gènes qui les composent : cela permettra la découverte de gènes impliqués dans ces maladies, étape indispensable pour comprendre les mécanismes, et ensuite rechercher les traitements capables de réparer les mécanismes déficients, ou tout simplement de prévoir les risques de maladie. Les études font également appel à des approches de type épidémiologique, afin d'isoler les facteurs extrinsèques mis en cause.

## **2. L'interaction de plusieurs facteurs**

Le point commun regroupant les maladies définies en tant que « maladies multifactorielles » est qu'elles résultent de l'interaction de plusieurs facteurs, génétiques, pathogéniques et environnementaux. La notion de « mortalité » n'est pas obligatoirement associée à ces maladies multifactorielles, leur degré de gravité variant selon les cas, et selon l'influence des paramètres extérieurs. Certains exemples de ce type de maladie, développés ci-dessous, démontrent la diversité des étiologies concernées, ne permettant jamais d'imputer une cause unique à l'origine de la maladie.

### **2.1 Un exemple chez l'humain : la sclérose en plaques**

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune où le système immunitaire attaque la matière blanche du système nerveux central. A certains endroits du cerveau se produit une réaction inflammatoire qui détruit la gaine de myéline qui entoure les nerfs. A ces endroits, les tissus peuvent soit se réparer, soit évoluer vers une cicatrice : ils se « sclérosent » par « plaques » (Figure 2). La conduction de l'influx nerveux est alors ralentie, voire complètement empêchée. La SEP est une maladie du jeune adulte, avec un âge moyen de déclenchement de 30 ans et une prépondérance féminine (1,7 femme pour 1 homme) : elle touche environ 2000000 de personnes dans le monde, dont environ 80000 en France et représente la première cause de handicap sévère non traumatique du jeune adulte.

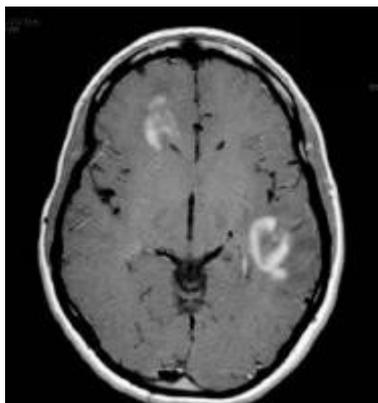


Figure 2 : IRM d'un patient atteint de sclérose en plaques : les zones de démyélinisation apparaissent en blanc, témoignant de la destruction de la myéline et de l'augmentation du contenu en eau.

Le caractère multifactoriel de la SEP repose sur l'intervention conjointe de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux, parmi lesquels les virus ont une place toujours débattue. En effet, de nombreux virus, tels que le virus d'Epstein-Barr ou le rétrovirus ont été impliqués dans la SEP, mais pour aucun d'entre eux un lien de causalité direct ou indirect n'a pu être mis en évidence. En ce qui concerne les facteurs environnementaux, il apparaît que les régions au climat tempéré seraient les plus touchées, et que l'ensoleillement et son influence sur les mécanismes de synthèse et d'action de la vitamine D puisse jouer un rôle. D'autres facteurs extérieurs tels que l'alimentation, les vaccinations (*i.e.* vaccin contre l'hépatite B), le stress, la pollution peuvent également intervenir, même si aucun de ces facteurs n'a fait la preuve à lui seul d'un rôle formel dans le déclenchement de la maladie. Parallèlement à cela, on soupçonne également des facteurs génétiques puisque dans une famille où la maladie est présente, le risque de la SEP est significativement plus élevé que dans une population témoin. De plus, des travaux récents ont identifié deux nouveaux gènes susceptibles d'accroître le risque de développement de la SEP, via la comparaison des séquences ADN de milliers de patients atteints avec celles de personnes indemnes de cette maladie : les nouveaux gènes identifiés contrôlent la fabrication de récepteurs à l'interleukine, protéines servant « d'antennes » à la surface des cellules immunitaires (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2008). L'identification de ces gènes s'ajoute à ceux préalablement identifiés dans les années 70, les gènes associés au système d'identification tissulaire (Human Leucocyte Antigen HLA) permettant au système immunitaire de distinguer le soi du non-soi (Ballerini *et al.*, 2004).

Ainsi, pour résumer, la SEP est une maladie multifactorielle dont on ne connaît pas la cause mais qui repose sur une anomalie immunologique liée à :

- une infection par un virus latent dont l'activation provoque une réponse immunitaire secondaire,
- la disposition génétique liée aux groupes tissulaires mais sans respect des lois mendéliennes,
- l'incidence des facteurs environnementaux avec une fréquence plus forte dans les pays à forte humidité et/ou à forte pollution.

Suite à ces premiers résultats, une vaste collaboration internationale s'est aujourd'hui mise en place afin de réunir les 10000 patients nécessaires à la poursuite de l'identification des gènes de prédisposition à la SEP, via des comparaisons transcriptomiques à haut débit. En effet, les gènes identifiés pourraient devenir des cibles pour le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique. De plus, une meilleure compréhension de la génétique de la SEP permettra d'adapter les traitements en fonction du profil génétique des patients et de leur réponse aux thérapies.

## 2.2 Un exemple chez les abeilles : l'effondrement des colonies

L'interaction de plusieurs facteurs associés au développement d'une maladie peut également être abordée dans le phénomène de sur-mortalité affectant les colonies d'abeille depuis le milieu des années 80 : le syndrome de disparition des abeilles ou « Colony Collapse Disorder (CDD) » en anglais. En effet, même si la mortalité des abeilles est un phénomène naturel dans les ruchers, se traduisant chaque hiver par 5 à 10% de pertes naturelles des colonies d'abeilles, il est apparu récemment un phénomène de mortalité dit « complexe » par la pluralité des causes suspectées, engendrant des mortalités considérables. Ainsi, aux Etats-Unis, près de 25% du cheptel aurait disparu durant l'hiver 2006-2007, mais l'on retrouve également ce phénomène dans d'autres pays (*i.e.* France, Belgique, Italie, Allemagne, Suisse, Espagne, Grèce, Pologne, Pays-Bas), avec parfois des pertes pouvant atteindre localement jusqu'à 90% des colonies (Van Engelsdorp *et al.* 2006). Le syndrome d'effondrement décrit le fait que les abeilles, subitement, ne rentrent pas dans leur ruche, et que l'on ne détecte pas de cadavres dans la ruche ou à proximité.

La multiplicité des causes évoquées dans la littérature pour expliquer les troubles des colonies d'abeilles, suggère que les origines de ce phénomène sont nombreuses et complexes. Sont évoqués des surmortalités, des syndromes de dépeuplement, des intoxications (aiguës ou chroniques), des mortalités foudroyantes, des mortalités insidieuses, des chutes de population, des désorientations (potentiellement liées à l'influence des ondes de téléphones portables et autres appareils), des comportements anormaux ... Pour expliquer ce phénomène, plusieurs pistes ont été étudiées ou avancées :

- l'action du virus Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), identifié via une large comparaison génétique d'abeilles affectées par le CDD et d'abeilles saines (Cox-Foster *et al.*, 2007). Ce virus, dont la présence est fortement corrélée dans des études avec le syndrome d'effondrement des colonies, apparaît donc comme un marqueur significatif du CDD. Cependant, il semblerait que ce virus ne puisse pas à lui seul provoquer les mortalités, et que l'intervention d'autres facteurs environnementaux soient nécessaires pour provoquer cette mortalité.

- l'action de pesticides (insecticides, désherbants, fongicides) retrouvés dans l'air et l'eau (Figure 3), suspectés d'avoir un effet imprévu sur la capacité de l'abeille adulte à s'orienter et ainsi à retrouver leur ruche.

- le parasitisme associé à *Varroa destructor*, parasite fréquent de l'abeille domestique ayant été véhiculé sur tous les continents par des transferts d'abeilles reproductrices ou de ruches.

- les pratiques apicoles, récemment intensifiées afin de répondre aux normes, au marché et à la concurrence internationale. Ainsi, la taille croissante des ruchers, la promiscuité des abeilles, la transhumance des ruchers et les échanges de souches de reproducteurs pourraient être favorables à l'apparition et à la diffusion de maladies épidémiques parasitaires, virales et fongiques.

- le stress associé aux déplacements fréquents des colonies, les rendant plus vulnérables aux parasites et aux maladies.

- la perte de la diversité génétique des ruchers associée au fait que les sélectionneurs aient privilégié la productivité en miel plus que la résistance ou l'adaptation génétique à l'environnement local, au détriment également des espèces sauvages.



Figure 3: Abeilles *Apis mellifera*, s'hydratant d'eau potentiellement polluée.

C'est finalement la synergie de ces différents facteurs qui semble aujourd'hui la plus probable pour expliquer cette surmortalité d'abeilles, dont l'origine semble multifactorielle. Le séquençage récent du génome complet de l'abeille (2006) va permettre, via l'identification des gènes et de leurs fonctions, de progresser dans la compréhension des processus physiologiques affectés lors de ces mortalités, et de mieux diagnostiquer les infections par les pathogènes et leurs impacts sur la santé des abeilles (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Enfin, l'utilisation de ces informations sur le génome aura certainement de nombreuses applications pour l'élevage et la sélection d'abeilles.

### 2.3 Un exemple chez les gorgones et les éponges : la mortalité de 1999

Les maladies multifactorielles, faisant intervenir des facteurs de pollution environnementale en association avec des infections bactériennes et des « sensibilités génétiques » trouvent également de nombreux exemples dans le milieu marin. Par exemple, durant l'été 1999, une mortalité massive de grands invertébrés marins a été observée sur les côtes de Provence (Perez *et al.*, 2000). En effet, des Spongiaires, des Cnidaires, des Bryozoaires, des Bivalves, des Ascidies, ont été mortellement touchés. Les mortalités sont apparues à l'est, avant de s'étendre vers l'ouest jusqu'à Marseille entre la mi-août et la mi-

octobre 1999. Des manifestations similaires ont été observées en Italie, depuis l'archipel toscan jusqu'à la frontière française, et des témoignages épars font état de mortalités en Grèce, en Tunisie et aux Baléares. Les éponges commerciales (*Hippospongia*, *Spongia*) et les gorgones (*Eunicella singularis* et *Paramuricea clavata*) ont été très sévèrement affectées (Figure 4), alors que la gorgone jaune *E. cavolinii* et le corail rouge *Corallium rubrum* ont mieux résisté. Ainsi, 90% des éponges commerciales du Parc National de Port-Cros ont été touchées; sur plus de 3000 colonies de gorgones *P. clavata* étudiées le long du littoral provençal, 92% présentaient des nécroses importantes.

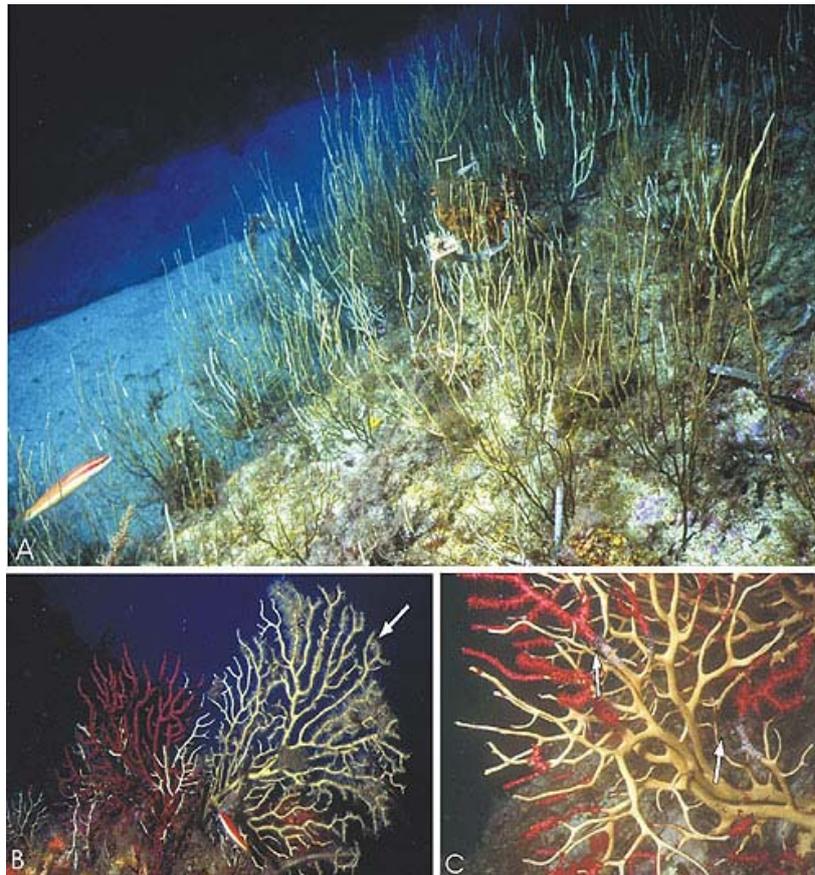


Figure 4 : Manifestation de la mortalité, conséquence des températures anormalement élevées de l'été 1999

A : La plupart des colonies gorgones situées au-dessous de 25 m ont été affectées.

B : Colonies de gorgones à un stade avancé de nécrose.

Plusieurs hypothèses ont été testées (pollution accidentelle, série synchrone d'épizooties, température trop élevée). L'analyse des données a mis en évidence une anomalie hydroclimatique zonale (associée à la Méditerranée nord-occidentale) engendrant une valeur élevée (mais non exceptionnelle) de la température. Cette augmentation de température,

combinée avec une durée anormalement longue et une extrême stabilité des masses d'eau, pourrait avoir joué un rôle clef dans la mortalité.

Cependant, ce facteur ne peut à lui seul être responsable de ce phénomène de mortalité, en raison de l'irrégularité spatiale des atteintes. Ainsi, plusieurs autres hypothèses ont été avancées pour expliquer le phénomène et sa variabilité dans le temps, l'espace et selon les espèces, comprenant :

- le stress thermique et son atteinte directe à l'intégrité de certaines fonctions métaboliques, avec une meilleure capacité de compensation du stress chez des individus préalablement stressés (c'est-à-dire soumis habituellement aux pollutions chroniques, à une forte turbidité),
- l'action d'agents pathogènes dont la virulence pourrait être favorisée par l'effet de la température, et dont l'activité serait favorisée par l'atteinte du métabolisme des organismes et notamment de leurs défenses chimiques : il pourrait alors être envisagé que ces pathogènes soient différents et de virulence variable selon les aires géographiques,
- l'introduction accidentelle et localisée de polluants, liée à de violents orages ayant pu causer une importante dessalure, une remise en suspension des sédiments, ou un lessivage des sols chargés en polluants,
- une variabilité génétique pouvant expliquer la variabilité de l'atteinte : il existerait des populations isolées, mieux équipées génétiquement que d'autres, afin de faire face aux fluctuations des conditions environnementales.

Les différentes hypothèses liées à l'apparition de ce phénomène démontrent bien la complexité des processus associés à cette mortalité. Les facteurs de stress énumérés peuvent expliquer les variations du niveau d'atteinte observées sur le terrain. La limite en profondeur de la mortalité corrobore l'idée d'un effet du réchauffement de la colonne d'eau. Le décalage dans le temps du phénomène et les différences observées en fonction de l'exposition pourraient être expliqués par l'action d'un altéragène (micro-biologique ou chimique) véhiculé par le courant liguro-provençal. En revanche, les variations du niveau d'atteinte sous les mêmes conditions environnementales, avec des individus ou des îlots de population totalement indemnes au milieu de peuplements sévèrement affectés, ne peuvent être expliquées que par des capacités de résistance individuelle variables, elles-mêmes probablement dépendantes de l'état de stress initial de l'animal. Ces analyses mettent donc en évidence les effets combinés de modifications environnementales avec d'autres facteurs d'altération physico-chimique.

Des analyses génétiques, couplées à toutes ces analyses, permettront d'évaluer la résistance de certaines populations locales, de comprendre les mécanismes à l'origine des événements de mortalité massive, et, éventuellement, de les anticiper avec des marqueurs précoces de stress.

Bien que cette mortalité soit multifactorielle, il semble que le stress thermique lié à l'élévation de température ait joué un facteur clef dans l'interaction conduisant à ce phénomène de mortalité. C'est également le cas dans les phénomènes de mortalités observés chez la moule, pour lesquelles on parle de mortalités estivales.

## 2.4 Un exemple chez la moule : les mortalités estivales

Plusieurs phénomènes de mortalité, apparaissant durant la période estivale, ont été observés chez la moule bleue *Mytilus edulis* (Figure 5). Les premiers cas ont été détectés en 1975, dans l'est du Canada, et se sont souvent reproduits depuis (Mallet *et al.*, 1990 ; Myrand & Gaudreault, 1995). Ces phénomènes de mortalité ont largement entravé la production de cette espèce, puisque les pertes peuvent atteindre localement 80% du cheptel. Ces phénomènes de mortalités estivales ont également été observés dans d'autres endroits, tels que sur les côtes Pacifique et Atlantique du Nord de l'Amérique (Mallet & Myrand, 1995).



Figure 5 : Moules bleues (*Mytilus edulis*).

Les études ont montré que l'étendue et la sévérité de ces mortalités pouvaient être extrêmement variables selon les stocks de moules analysés, même si ces derniers provenaient du même environnement (Myrand & Gaudreault, 1995). En effet, il semblerait que ces mortalités soient mieux expliquées par le facteur génétique que par le facteur environnemental. Des hypothèses indiquent que la plus forte sensibilité observée pour certains lots serait liée à un degré plus fort d'homozygotie générale, entraînant des baisses de performance au niveau de nombreux processus physiologiques. En effet, plusieurs études ont démontré l'association existant entre l'homozygotie et les performances de « maintenance métabolique » (Hawkins & Bayne, 1992, Tremblay *et al.*, 1998). Ainsi, il semblerait que la plus forte demande métabolique associée à des degrés réduits d'hétérozygotie engendre un stress supplémentaire et rende ces stocks de moule plus sensibles à la mortalité estivale (Tremblay *et al.*, 1998, Myrand *et al.*, 2002).

Il a également été montré que les faibles performances des lots de moule à fort taux d'homozygotie pouvaient parfois être considérablement affectées par des conditions environnementales stressantes (Tremblay *et al.*, 1998). En effet, plusieurs facteurs de stress ont été identifiés comme des facteurs aggravant la susceptibilité des moules à la mortalité estivale, tels que la présence de pathogènes dans le milieu, une température élevée de l'eau (>20°C), ou encore l'appauvrissement de la disponibilité en nourriture dans le milieu (Tremblay *et al.*, 1998). Cependant, aucun de ces facteurs aggravants ne semble à lui seul pouvoir provoquer la mortalité des moules. Par contre, l'état physiologique de l'animal, associé à la période de reproduction, semble jouer un rôle majeur dans l'apparition de ces mortalités (Myrand *et al.*, 2000). En effet, cette période de reproduction, via la production de gamètes et les phénomènes de ponte, semble créer un déficit énergétique pouvant être fatal à l'animal, ne disposant plus de l'énergie suffisante pour se défendre contre les facteurs stressants extérieurs. L'effort reproductif de cette période, défini par la production de gamètes par rapport à la production totale, peut atteindre plus de 50%, et peut ainsi expliquer l'extrême sensibilité des moules aux conditions environnementales stressantes, car elles allouent plus de la moitié de leur énergie à la reproduction : on parle alors de « coût de la reproduction » ayant une incidence sur la survie des individus (Luiselli *et al.*, 1996).

Les études réalisées sur ce phénomène de mortalité estivale affectant la moule mettent donc en évidence la corrélation de plusieurs facteurs à l'origine de ce phénomène : l'homozygotie des individus, la période de reproduction, et la présence dans le milieu de facteurs aggravants tels que la présence de polluants, l'affaiblissement des ressources trophiques, ou encore la température de l'eau, via son influence sur la reproduction.

Il existe ainsi dans le milieu marin de nombreux exemples de maladies multifactorielles conduisant à des mortalités que l'on nomme « mortalités estivales ». Nous pouvons citer les exemples de mortalités estivales affectant les ormeaux *Haliotis tuberculata* (Travers *et al.*, 2008) ou encore celui de la Juvenile Oyster Disorder affectant l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Meyers *et al.*, 1981). Un autre cas est celui des mortalités estivales affectant l'huître creuse *Crassostrea gigas* que nous allons détailler ci-dessous.

## 2.5 : Un exemple chez l'huître creuse : les mortalités estivales

Les premiers phénomènes dits de « mortalité estivale » observés chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* ont été observés au Japon dès 1945 (Koganezawa, 1975). Par la suite, des mortalités chroniques ont été rapportées aux Etats-Unis (Cheney *et al.*, 2000) et en Europe (Gouletquer *et al.*, 1998).

En France, où l'huître *Crassostrea gigas* est cultivée depuis la fin des années 1970, des mortalités significatives ont eu lieu en 1976-77 dans le Bassin de Marennes Oléron (Parache, 1989), puis en 1982-83 sur le bassin d'Arcachon (Maurer *et al.*, 1986), en 1988 et juin 1993 dans le bassin de Marennes Oléron, en 1994-95 dans plusieurs sites de Bretagne Sud (Gouletquer *et al.*, 1998) et en 1998, 2000 et 2001 en baie des Veys (Costil, 2005). Les mortalités anormales d'huîtres creuses, tant sur les concessions en mer (estran, eaux profondes), en écloséries et nurseries, en bassins à terre et claires, qu'au niveau des gisements naturels exploités, doivent faire l'objet de déclarations officielles aux autorités concernées. La réglementation les définit en élevage et sur des gisements naturels comme toutes mortalités subites affectant plus de 15 % d'un stock dans un intervalle maximal de 15 jours.

Malgré l'observation du phénomène de mortalité estivale depuis plusieurs décennies, les causes responsables de ces mortalités demeuraient assez mal connues jusqu'à ces dernières années. C'est dans ce contexte que l'IFREMER a initié en 2001 un programme multidisciplinaire nommé « MOREST » (pour MORTalités ESTivales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*). Dans le cadre de ce programme, les données répertoriant les taux de mortalité de l'huître creuse *C. gigas* en France de 1992 à 2005 ont été regroupées (Figure 6). L'analyse globale de ces données pour des huîtres de deux classes d'âge (1 et 2 ans) a montré

une grande variabilité dans l'intensité de ces mortalités selon les sites étudiés, et selon les années.

Plus récemment, en mai 2008, de très fortes mortalités anormales ont été recensées, et l'huître creuse semble être l'unique espèce de coquillage affectée par ces mortalités, dont les taux ont pu atteindre 80 à 100% sur certains lots. Les conséquences socio-économiques de ces phénomènes de mortalités sont très importantes. Les écloveurs, les naisseurs et les demi-éleveurs sont les plus immédiatement touchés dans la mesure où ce sont les produits qu'ils élèvent et commercialisent qui ont été majoritairement atteints.

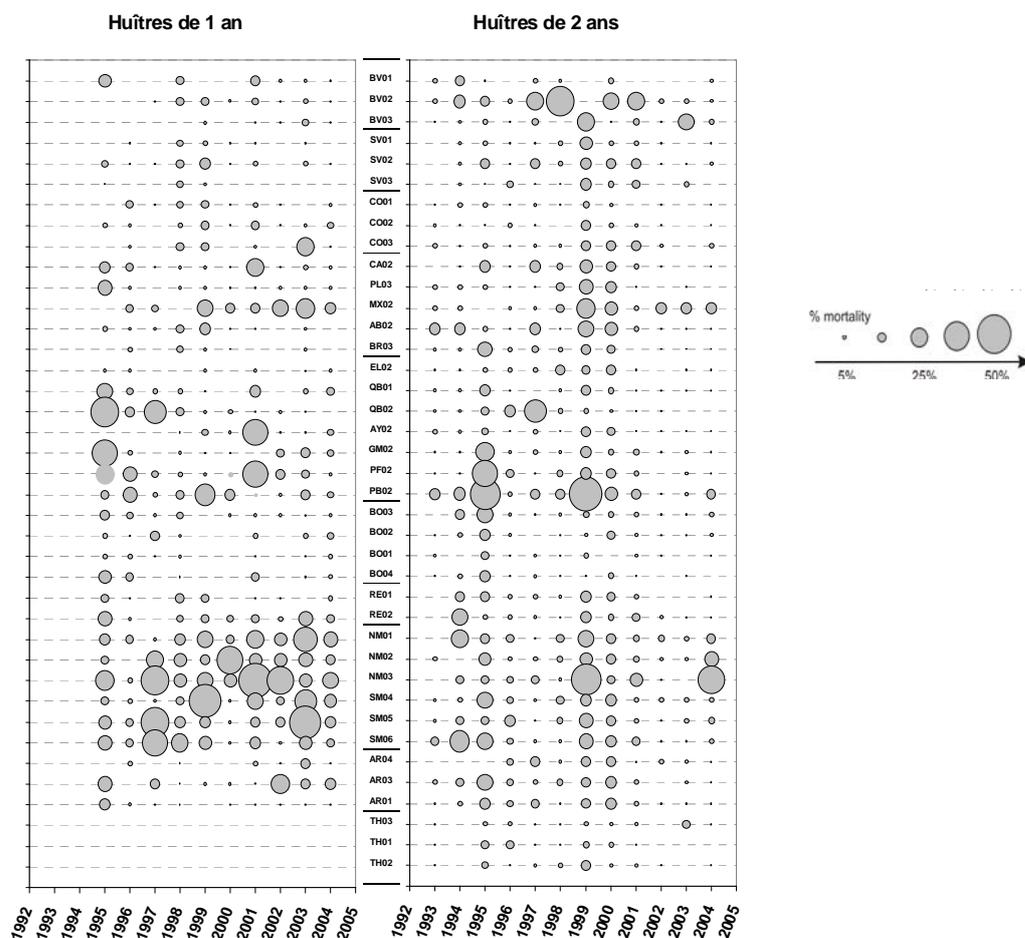


Figure 6: Taux de mortalités des huîtres de 1 an et de 2 ans le long du littoral français entre 1995 et 2004 (1 an) et 1993 et 2004 (2 ans). Régions : Baie des Veys (BV), Saint Vaast-La-Hougue (SV), Côte Ouest Cotentin (CO), Baie de Cancale (CA), Paimpol (PL), Morlaix (MX), Aber Benoit (AB), Rade de Brest (BR), Rivière d'Etel (EL), Baie de Quiberon (QB), Rivière d'Auray (AY), Golfe du Morbihan (GM), Baie de Penerf (PF), Pen-Bé (PB), Baie de Bourgneuf (BO), Île de Ré (RE), Nord Marennes Oléron (NM), Sud Marennes Oléron (SM), Bassin d'Arcachon (AR), Etang de Thau (TH).

D'après Samain & McCombie (2008).

L'issue du programme MOREST, en 2005, a permis de montrer qu'il n'était pas possible d'expliquer ce phénomène par l'unique intervention d'un agent pathogène (virus ou bactérie), mais que celui-ci était nécessaire, en lien avec d'autres facteurs. En effet, les résultats montrent que l'environnement, mais aussi le statut de l'huître semblent avoir une très forte implication dans l'apparition de mortalité estivale. Ainsi, la piste d'une étiologie multifactorielle faisant intervenir plusieurs compartiments représentés par l'environnement, les pathogènes et l'huître a donc été privilégiée. Plus précisément, ce principe d'interaction conduisant à la mortalité suppose que l'environnement intervient via :

- la température
- la salinité
- l'oxygène dissous
- la disponibilité trophique
- la pollution.

Les pathogènes interviennent également, et leur influence semble modulée par :

- des facteurs génétiques liés aux pathogènes
- la virulence

Enfin, le statut de l'huître participe à cette interaction via :

- les facteurs génétiques liés à l'huître
- l'âge
- la physiologie
- les capacités de défense
- la nutrition.

Malgré les grandes avancées obtenues dans le cadre du programme MOREST, les origines précises du phénomène des mortalités estivales de l'huître creuse *C. gigas* sont toujours assez floues. Plus particulièrement, les mécanismes physiologiques altérés provoquant la sensibilité de certaines souches d'huîtres ne sont toujours pas clairement identifiés. C'est donc dans ce contexte qu'ont été initiés les travaux présentés dans la suite de ce manuscrit, travaux qui visent à identifier et caractériser les marqueurs moléculaires associés à la mortalité.



---

# **Contexte de l'étude & objectifs**

---



Dans ce chapitre, nous aborderons dans un premier temps la systématique des huîtres creuses et plus précisément de *C. gigas*, puis les données biologiques associées. Ensuite, une synthèse des données obtenues dans le cadre du programme MOREST sera présentée pour mettre en évidence les facteurs maintenant connus pour leur importance dans l'interaction conduisant aux mortalités estivales. Un éclairage sera apporté sur la caractérisation phénotypique des souches Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale pour aider à la compréhension de la composante « huître » dans cette interaction. Enfin, le dernier paragraphe développe la problématique et les objectifs de cette thèse.

## 1. Présentation du modèle biologique

### 1.1 L'ostréiculture, histoire et enjeux actuels

Le secteur de l'aquaculture présente l'une des croissances les plus rapides dans le monde. En 2003, la production aquacole mondiale a atteint près de 42,3 millions de tonnes (données FAO, <http://faostat.fao.org/faostat/>). Dans ce secteur, les mollusques représentent une production de l'ordre de 19,4 millions de tonnes à l'échelle mondiale, dont 4,7 millions de tonnes d'huîtres. En France, l'ostréiculture constitue la première production aquacole. Elle repose essentiellement sur l'huître creuse du Pacifique ou huître japonaise *C. gigas* (115000 tonnes/an en 2003) et de façon plus anecdotique sur l'huître plate *O. edulis* (2000 tonnes/an en 2003) (FAO, 2003).

Historiquement, l'ostréiculture a connu en France une succession de phases de développement, de pleine exploitation et de crises engendrées par une surexploitation des ressources naturelles et/ou par l'apparition de maladies. L'huître plate *O. edulis*, seule espèce endémique des côtes françaises, a ainsi été exploitée pendant plusieurs siècles, mais la pêche intensive associée à une demande croissante du marché a conduit à une destruction des bancs naturels. Pour faire face à cette pénurie, l'huître creuse du Portugal, *Crassostrea angulata*, a été importée en France à partir de 1860, et accidentellement introduite dans le milieu naturel quelques années plus tard. Cette espèce rustique a rapidement proliféré le long des côtes et les deux espèces ont dès lors été cultivées, parfois conjointement (Héral, 1985). Des épisodes de mortalités massives provoquées par l'apparition de parasites (dont *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*) dans les gisements d'huîtres *O. edulis* au cours des années 1920, 1960 et

1970 ont précipité l'arrêt de la production de cette espèce (Grizel, 1974). Entre 1969 et 1973, la production d'huîtres portugaises a, à son tour, été décimée par une infection virale due à un *Iridovirus*, responsable de la « maladie des branchies » (Comps 1988).

Afin de relancer l'industrie ostréicole, une nouvelle espèce originaire du Japon, *C. gigas*, déjà cultivée avec succès sur la côte ouest des Etats-Unis et du Canada, a donc été introduite en France à partir de 1972. Depuis cette date, la culture de *C. gigas* a connu une expansion rapide, cette espèce représentant aujourd'hui 99% du marché ostréicole français et 93% du marché mondial (FAO, 2003). Ainsi, l'importance économique associée à *C. gigas* a motivé le développement de nombreuses recherches concernant la biologie de cette espèce. Les autres justifications de ces recherches sont liées au fait que l'huître creuse se révèle être une espèce sentinelle de choix pour comprendre l'évolution des écosystèmes côtiers et estuariens, milieux de plus en plus anthropisés où les populations d'huîtres sont exploitées, et où elles subissent des mortalités liées au stress et aux maladies.

## 1.2 Systématique et répartition

Les huîtres appartiennent à la classe des mollusques bivalves, qui comprend plus de 12000 espèces au sein du groupe de Lophotrochozoaires. Ce groupe est peu documenté au niveau biologique et génomique, en comparaison aux deux autres groupes d'animaux à symétrie bilatérale : les Ecdysozoaires et les Deutérostomiens (Figure 7).

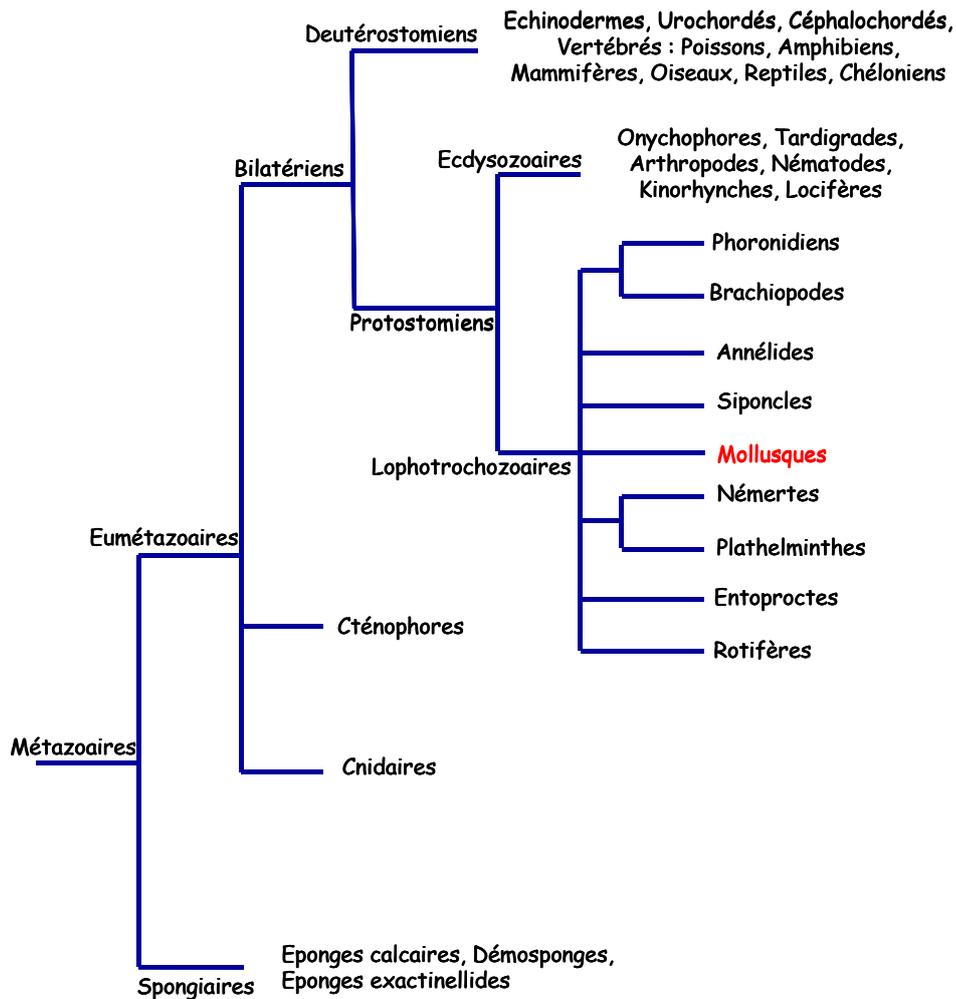


Figure 7 : Classification phylogénétique des Métazoaires, simplifiée.

D'après Le Cointre & Le Guyader (2001).

Les huîtres sont de l'ordre des Eulamellibranches, de la super-famille des Ostréidés, de la famille des Crassostréidés et du genre *Crassostrea*. Une vingtaine d'espèces ont été décrites dans le genre *Crassostrea*, certaines ayant été ou étant exploitées comme *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) l'huître creuse japonaise (Figure 8), *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) l'huître creuse portugaise, *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928), *Crassostrea ariakensis* (Fujita, 1913) ou *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) l'huître creuse américaine.

*C. gigas* est originaire d'Asie mais plusieurs vagues d'importations volontaires ou accidentelles ont disséminé l'espèce dans de nombreuses régions du globe, en Europe (Grizel & Héral, 1991), au Canada, sur la côte Ouest des Etats-Unis, en Afrique du sud, en Tasmanie (Thomson, 1952; 1958), en Nouvelle-Zélande et en Russie (Orlenko, 1994). Elle s'est adaptée dans ces régions notamment grâce à sa forte croissance et à sa grande tolérance aux variations

de température (eurytherme), de salinité (euryhaline) et de quantité de nourriture (Coleman, 1986; Smith *et al.*, 1986; Grizel, 1996).



Figure 8 : L'huître creuse *Crassostrea gigas* ouverte, valve droite enlevée.

## 1.2 Ecologie et biologie

Les huîtres occupent deux biotopes différents au cours de leur cycle de développement. Les embryons et les larves sont planctoniques jusqu'à leur fixation. Après la métamorphose, les juvéniles et les adultes sont benthiques. Ils se fixent sur des substrats meubles ou durs dans les zones intertidales et infralittorales ou dans les zones estuariennes.

Les huîtres sont des animaux à corps mou comprimé latéralement et renfermé dans une coquille à deux valves asymétriques articulées autour d'une charnière et maintenues par un muscle adducteur puissant (Figure 9). La valve inférieure (gauche) est creuse tandis que la valve supérieure (droite) est plane (Kennedy *et al.*, 1996). La coquille se compose de trois couches : (1) la couche externe, le périostracum, (2) la couche intermédiaire composée de carbonate de calcium et reposant sur une matrice de conchyoline (protéique) et (3) la couche interne formée de cristaux d'aragonite en empilements horizontaux qui forment la nacre.

Les parties molles du corps sont enveloppées dans un manteau dont les deux lobes sont soudés dorsalement près de la bouche. Le manteau délimite la cavité palléale. Dans la partie antérieure, il forme un capuchon céphalique qui recouvre les palpes labiaux et la bouche (Kennedy *et al.*, 1996).

Les huîtres sont acéphales, la bouche et les palpes labiaux sont les seuls vestiges de la partie céphalique. Le système digestif est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, la glande digestive, le rectum et l'anus. Les branchies lamellaires, suspendues dans la cavité palléale, assurent la double fonction de respiration et de nutrition.

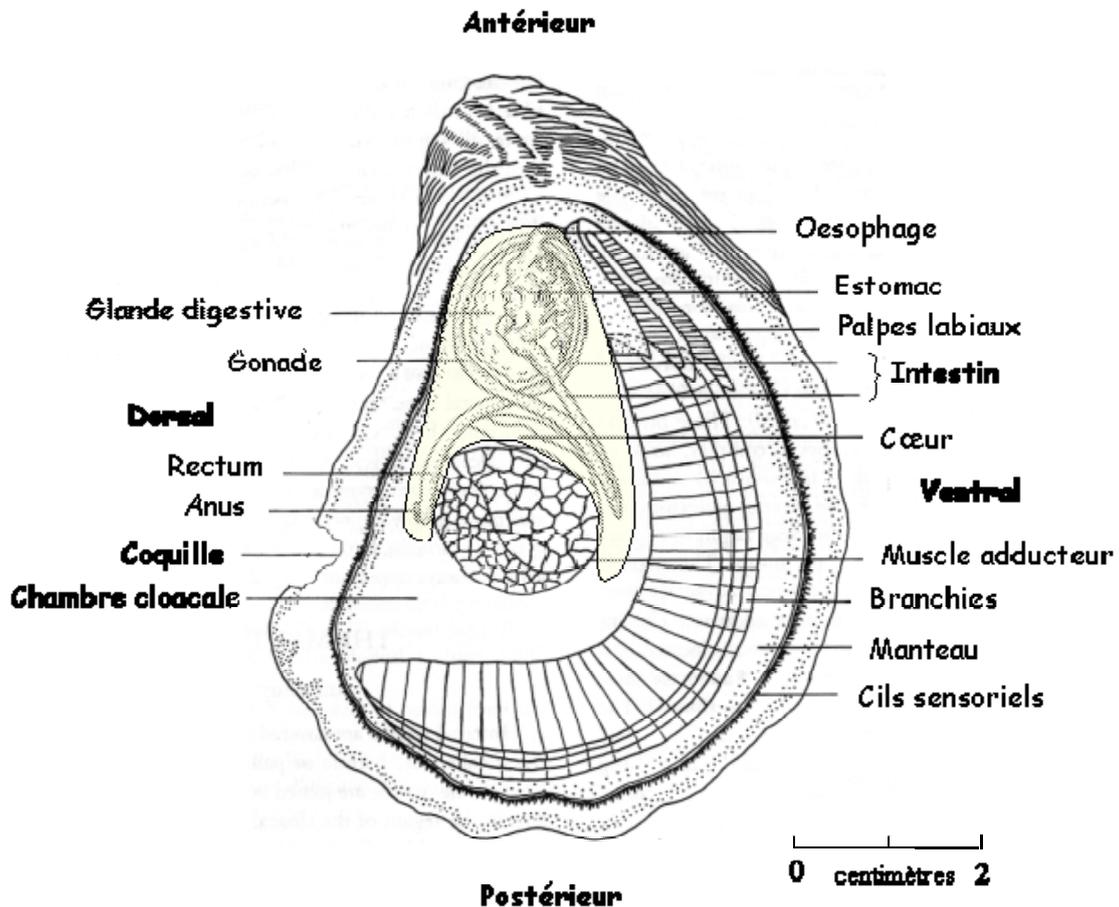


Figure 9 : Anatomie générale de l'huître américaine *Crassostrea virginica* dans sa valve gauche. Les axes d'orientation de l'animal sont indiqués en caractère gras. D'après Galtsoff (1964).

Le système circulatoire des huîtres est partiellement clos. Il est composé de vaisseaux et de sinus cœlomiques (Figure 10). Le cœur comporte un ventricule et deux oreillettes, et est situé contre le muscle adducteur de la cavité péricardique. Le ventricule expulse le fluide circulant, appelé hémolymphe, dans les aortes antérieures et postérieures. L'hémolymphe circule ensuite dans les artères et les artérioles, puis dans des sinus de taille variable qui mettent les organes au contact direct de l'hémolymphe. Celle-ci est ensuite épurée dans le rein, puis circule vers les branchies par des vaisseaux afférents et en repart, après hématose, par les vaisseaux efférents jusqu'aux oreillettes.

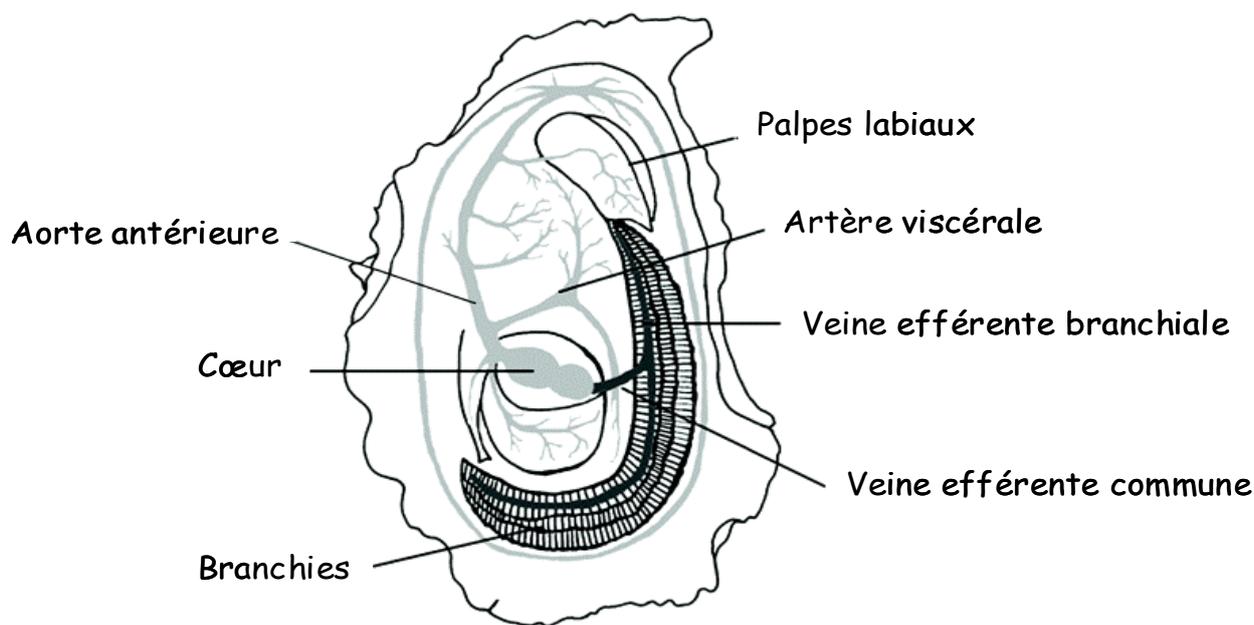


Figure 10 : Organisation du système circulatoire chez l'huître *Crassostrea gigas* (Bachère *et al.*, 2004)

## 1.3 Reproduction

### 1.3.1 L'hermaphrodisme

L'huître creuse japonaise est un hermaphrodite protandre de type alternatif irrégulier (Galtsoff, 1964; Gérard *et al.*, 1995), ce qui signifie qu'elle est généralement mâle lors de la première saison de reproduction puis que les changements de sexe alternent ensuite de façon irrégulière chez un même individu (Guo *et al.*, 1998; Lango-Reynoso *et al.*, 1999), les changements de sexe se faisant principalement entre deux saisons de reproduction (Buroker, 1983). Une faible proportion d'individus morphologiquement hermaphrodites, pour lesquels des cellules germinales des deux sexes sont présentes simultanément dans la gonade, est généralement trouvée dans les populations (Lango-Reynoso, 1999). Le déterminisme du sexe est encore peu connu chez *C. gigas* mais il résulterait de la combinaison de l'expression de facteurs génétiques (Naimi *et al.*, 2008) et de l'effet des facteurs environnementaux (Guo *et al.*, 1998).

### 1.3.2 Anatomie de la gonade

La gonade de l'huître est un tissu mixte constitué de glandes génitales acineuses paires ramifiées dont les prolongements s'insinuent dans le tissu conjonctif vésiculeux. Elle se développe autour de la glande digestive. Les canaux des acini, les tubules gonadiques, s'anastomosent à leur extrémité pour former le conduit évacuateur ou gonoducte qui débouche dans la cavité palléale (Devauchelle *et al.*, 1998). Au fur et à mesure de leur développement, les deux parties de la gonade fusionnent pour ne former qu'une masse qui occupe une grande partie de la cavité palléale à maturité (Figure 9). Cet organe, qui n'est pas permanent, se régénère annuellement à chaque cycle de reproduction et régresse après l'émission des gamètes. Pendant la période de repos sexuel, la gonade n'est représentée que par quelques cellules germinales souches (ou Primordial Germ Cells) noyées au sein du tissu conjonctif (Fabioux *et al.*, 2004a).

### 1.3.3 Développement de la gonade

Chez *C. gigas*, le premier développement gonadique a lieu au cours de la première année de vie des animaux, au stade juvénile. Les premières cellules germinales différenciées, les gonies (ovogonies ou spermatogonies), se développent au niveau de l'épithélium germinal et se divisent intensément par mitose. Ce sont des cellules de petite taille (6 µm de diamètre) composées d'un gros noyau et d'une fine couche de cytoplasme granuleux (Kennedy *et al.*, 1996; Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Les gonies se différencient en cytes primaires (ovocytes ou spermatocytes) et entrent en méiose (Figure 11). La gamétogenèse s'effectue de façon centripète dans les tubules gonadiques, depuis l'épithélium germinal jusqu'à la lumière centrale. Les cytes primaires sont donc situés derrière la couche de gonies par rapport à l'épithélium gonadique (Lango-Reynoso, 1999).

Chez les mâles, les spermatocytes primaires poursuivent leur méiose et se différencient successivement en spermatocytes secondaires, en spermatides et en spermatozoïdes (dont le corps mesure 1,5 - 3 µm de diamètre) (Franco *et al.*, 2008). La taille des cellules germinales mâles diminue au fur et à mesure de leur différenciation, leur noyau se condense et le cytoplasme devient quasiment inexistant (Kennedy *et al.*, 1996).

Chez les femelles, lorsque les ovogonies se différencient en ovocytes primaires (20 - 30 µm de diamètre), leur noyau s'agrandit et le cytoplasme devient plus dense et granuleux au fur et à mesure de la vitellogenèse (maturation), traduisant une accumulation des protéines,

d'ARNm et de lipides (Kennedy *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2000). Le développement des ovocytes est supporté par les réserves, essentiellement du glycogène, contenues dans les cellules vésiculeuses du tissu conjonctif environnant et probablement par les cellules auxiliaires des ovocytes (Berthelin *et al.*, 2000b; Matsumoto *et al.*, 2003). Les ovocytes vitellogéniques se détachent de la paroi du tubule et les ovocytes matures (40 - 50  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont libres au centre du tubule gonadique (Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Les ovocytes émis lors de la ponte sont bloqués en prophase I de méiose. L'émission dans l'eau de mer, puis la fécondation, déclenchent successivement la reprise de la méiose et la rupture de la vésicule germinative, puis l'expulsion du premier globule polaire (Leclerc *et al.*, 2000).

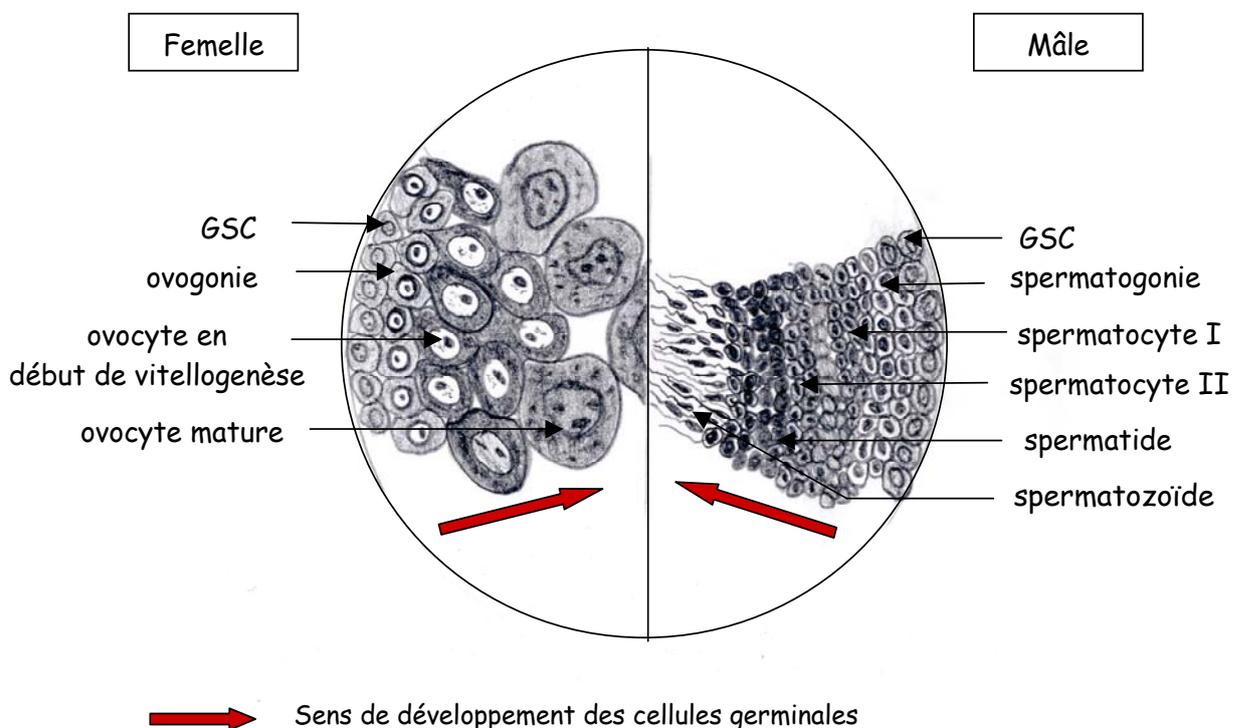


Figure 11 : Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de *Crassostrea gigas* pendant la gamétogenèse. Représentation schématique de la coupe transversale d'un tubule. GSC : cellule germinale souche. D'après C. Fabioux (2004).

#### 1.3.4 Le cycle de reproduction

Le cycle de reproduction de *C. gigas* suit un rythme saisonnier (Figure 12). Le long des côtes françaises, la gamétogenèse se déroule à un rythme très lent durant l'automne et au début de l'hiver (Lubet, 1991). Puis les cellules germinales se développent activement à la fin

de l'hiver (Gouletquer, 1997; Lango-Reynoso *et al.*, 1999), via une phase de multiplication intense des gonies (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Fabioux, 2004).

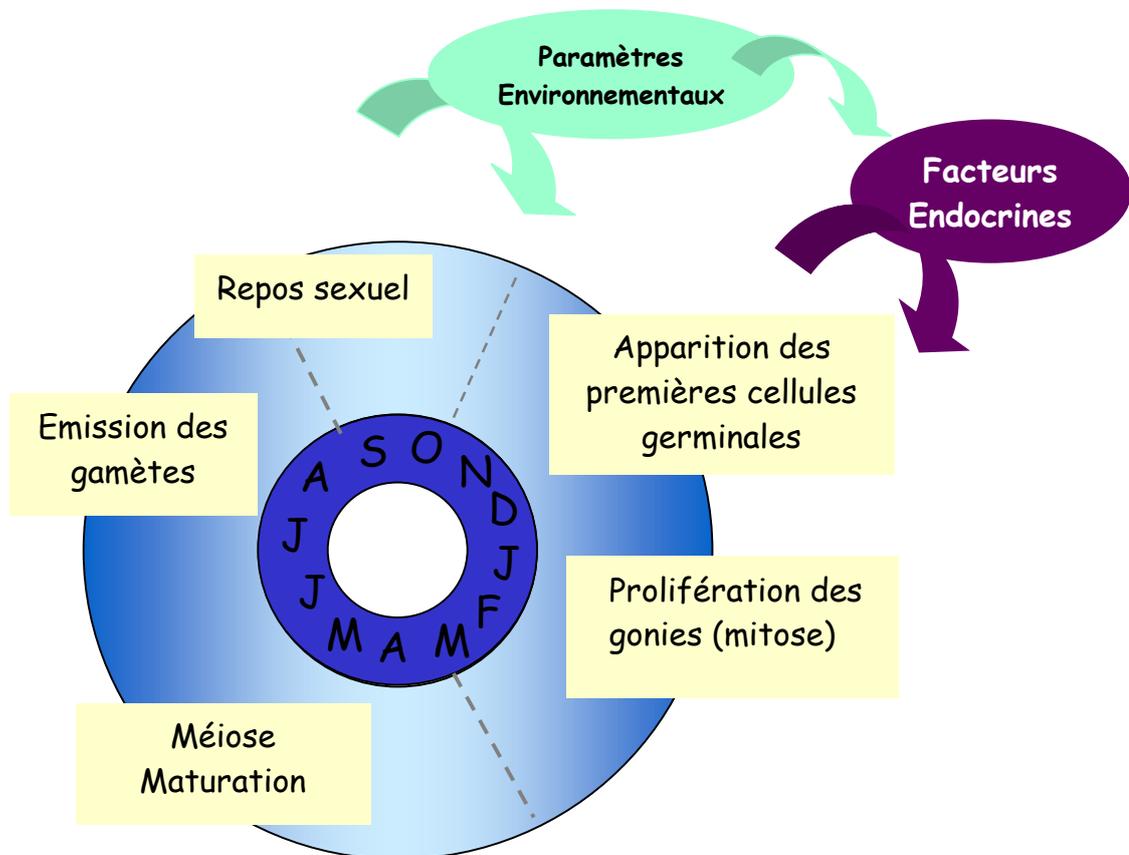


Figure 12 : Chronologie des grandes étapes du cycle de reproduction de *Crassostrea gigas* en milieu tempéré. Les flèches indiquent l'action potentielle des facteurs internes et des paramètres environnementaux sur l'ensemble des étapes de la reproduction. Les lettres dans le disque correspondent aux mois de l'année. D'après C. Fabioux (2004).

Le printemps est la période de maturation des cellules germinales, période principalement contrôlée par la température et la quantité de nourriture (Deslous-Paoli *et al.*, 1981) (Figure 14). Les gamètes arrivent à maturité à la fin du printemps ou au début de l'été. L'émission des gamètes a lieu, généralement pendant la période estivale, une ou plusieurs fois par an suivant la localisation géographique (Galtsoff, 1930; Gouletquer, 1997; Lango-Reynoso *et al.*, 1999; Chavez-Villalba *et al.*, 2001). Elle intervient souvent en réponse à un signal extérieur, essentiellement des changements de température, un bloom phytoplanctonique ou la présence dans l'eau de gamètes d'individus de la même espèce. L'émission des gamètes est totale dans les régions les plus chaudes des côtes françaises

(Charentes, Méditerranée) alors qu'elle n'est que partielle voir absente dans le nord de la France où la température de l'eau est plus basse (Normandie ou Bretagne Nord) (Goulletquer, 1997). Lorsque la ponte est partielle, les ovocytes résiduels de la gonade subissent une phase de régression au cours de laquelle le contenu cellulaire est lysé. L'énergie issue de cette résorption des gamètes pourrait être réinvestie dans le métabolisme de base des bivalves (Benninger & Le Pennec, 1991; Steele & Mulcahy, 1999). Les réserves énergétiques de l'huître sont reconstituées à l'automne avant la ré-initiation d'un nouveau cycle de reproduction (Berthelin *et al.*, 2000b).

Les huîtres ont une fécondité très élevée, plusieurs millions d'ovocytes sont émis en pleine eau à chaque événement de ponte (Héral, 1985 ; Gérard, 1998). Elles suivent une stratégie de reproduction dite de type "r" avec un cycle de développement court mais à fort potentiel de reproduction (Lubet, 1976; Takada & Nakajima, 1992). La fécondation de *C. gigas* est externe et le développement, indirect, passe par une phase larvaire planctonique.

## 1.4 Développement

Le développement embryonnaire des mollusques (excepté chez les céphalopodes) est de type spiralé. Après la fécondation, l'embryon subit une série de clivages extrêmement réguliers donnant lieu à un arrangement en "spirale" des blastomères jusqu'à la formation de la blastula (Figure 13). Après la segmentation, la larve blastula subit la gastrulation : les cellules se réorganisent en trois feuillets primordiaux (endoderme, mésoderme et ectoderme). Puis, la larve devient nageuse, elle acquiert alors des groupes de cils au niveau apical et en couronne périphérique : c'est la larve trochophore. Une première ébauche de coquille se développe et deux valves minéralisées se forment. La larve devient véligère, successivement larve-D, véligère à umbo puis larve oeillée. Un velum se développe, servant d'organe natatoire, respiratoire et nourricier. Lorsque la véligère est totalement formée, le velum se rétracte et les valves se referment grâce au muscle adducteur. Les rudiments de branchies apparaissent au bord de la masse viscérale et un pied se développe ventralement, c'est le stade pédivéligère (Prieur, 1971). Au cours de la métamorphose, la plupart des tissus et des organes larvaires se réorganisent pour donner la forme juvénile. Ainsi, les tissus du pied et du velum sont phagocytés (Waller, 1981; Burke, 1983), les ganglions nerveux qui étaient différenciés fusionnent et des tissus adultes (cœur, rein, branchies) s'élaborent à partir de tissus indifférenciés même s'ils commencent à se mettre en place avant la métamorphose (Prieur,

1971). A une température moyenne de 25°C, il faut entre 15 et 24 jours pour obtenir un développement larvaire complet, *i.e.* de la fécondation à la fixation (Figure 13).

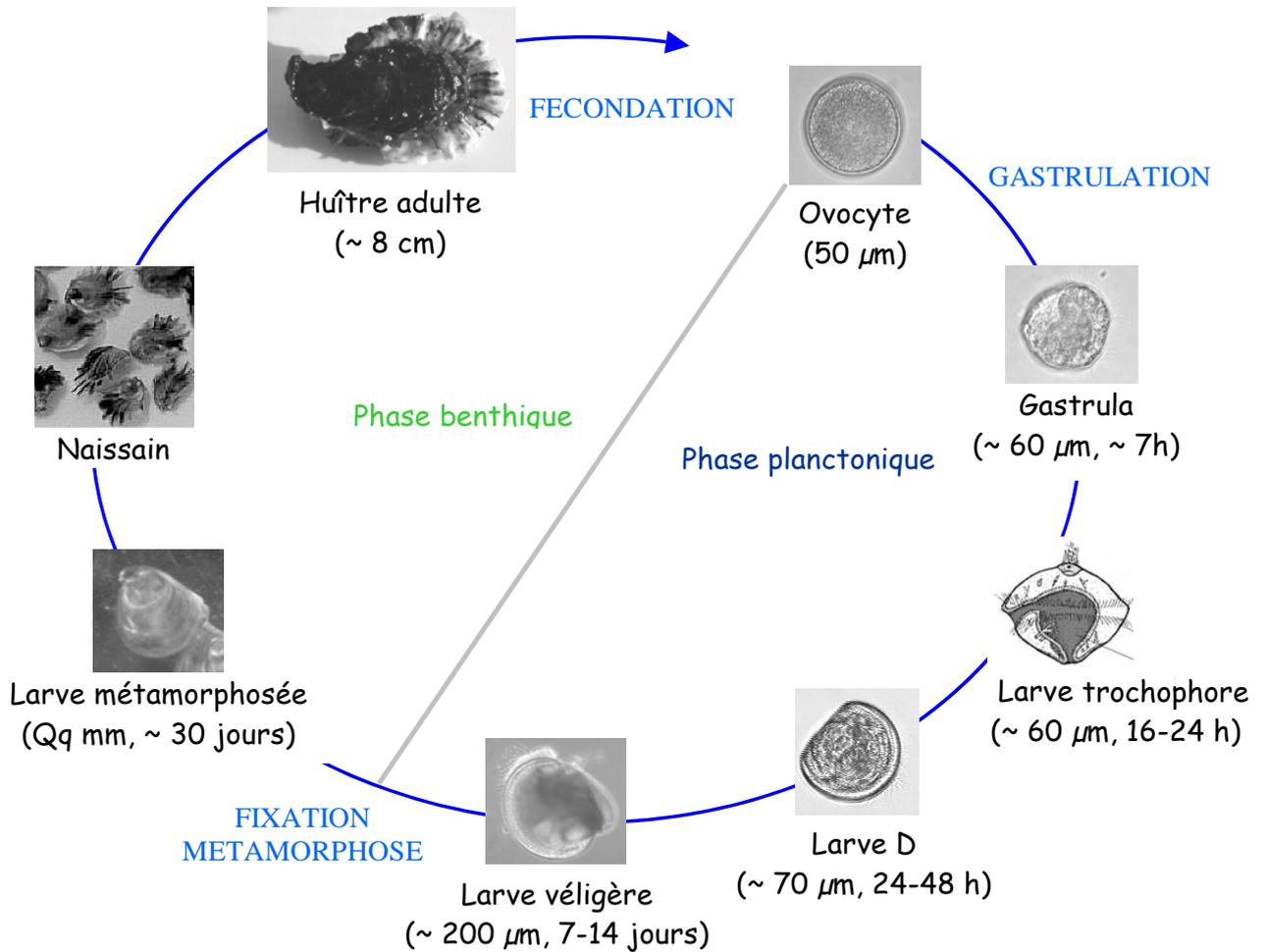


Figure 13 : Cycle de développement de l'huître *Crassostrea gigas*.

## 1.5 Nutrition de l'huître

L'huître se nourrit de particules microscopiques en suspension dans l'eau de mer. Ces particules sont principalement constituées de phytoplancton (microalgues) mais aussi de bactéries, zooplancton et de débris d'organismes morts.

La rétention de nourriture se fait grâce aux branchies qui filtrent les particules nutritives contenues dans l'eau de mer. Les particules sont triées selon la taille au niveau des

palpes labiaux et les particules dont la taille est trop élevée sont éliminées sous formes de pseudo fécès. La bouche s'ouvre sur un œsophage court qui aboutit à l'estomac, où s'effectue un broyage mécanique et une attaque enzymatique des particules. Les résidus de la digestion pénètrent finalement dans un intestin long où l'absorption des nutriments se poursuit. Les matières fécales (fécès) sont formées dans le rectum et expulsées par l'orifice anal.

Comme pour tous les animaux, l'alimentation des mollusques bivalves doit fournir l'ensemble des éléments nutritifs (glucides, lipides, protéines, vitamines, minéraux) nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme. Ces éléments dépendent de la disponibilité en micro-algues dans le milieu, elle-même sous l'influence des conditions environnementales. L'énergie et la matière organique résultantes sont alors utilisées aux diverses fonctions de l'organisme (biodéposition, excrétion, respiration, croissance, reproduction, défenses immunitaires). L'alimentation influence également l'intensité de maturation de l'huître (Enriquez-Diaz, 2004), la fécondité (correspondant au nombre d'œufs émis) et le nombre de larves produites.

## 1.6 Gestion des réserves énergétiques

Les réserves énergétiques, soutenues par l'apport direct de nutriments, sont principalement utilisées pour palier à la reproduction qui occasionne d'importantes dépenses énergétiques. Chez *C. gigas*, ces réserves sont essentiellement constituées par du glycogène et certains lipides dits de réserve (triglycérides et stérols) (Gabbott, 1986). Chez la plupart des bivalves marins, le glycogène joue en effet un rôle central dans le support énergétique du métabolisme de maintenance et de la gamétogenèse (Gabbott, 1975 ; Bayne *et al.*, 1982 ; Ruiz *et al.*, 1992 a et b).

L'évolution saisonnière du taux de glycogène est liée aux différentes phases du cycle annuel de reproduction. Chez *C. gigas*, le tissu de réserve est présent majoritairement dans les palpes labiaux et la région gonade-manteau (Berthelin *et al.*, 2000a). Dans les palpes labiaux, la quantité de cellules impliquées dans le stockage du glycogène présente peu de variation saisonnière alors qu'elle varie fortement au cours de l'année dans la région gonade manteau (Figure 14) (Berthelin *et al.*, 2000b). En automne, le tissu de réserve est encore fortement répandu dans la région gonade-manteau (Figure 14, A). Au printemps / été, cette région est

envahie par les tubules gonadiques (plus foncé) et il n'y a presque plus de tissu de réserve (Figure 14, B).

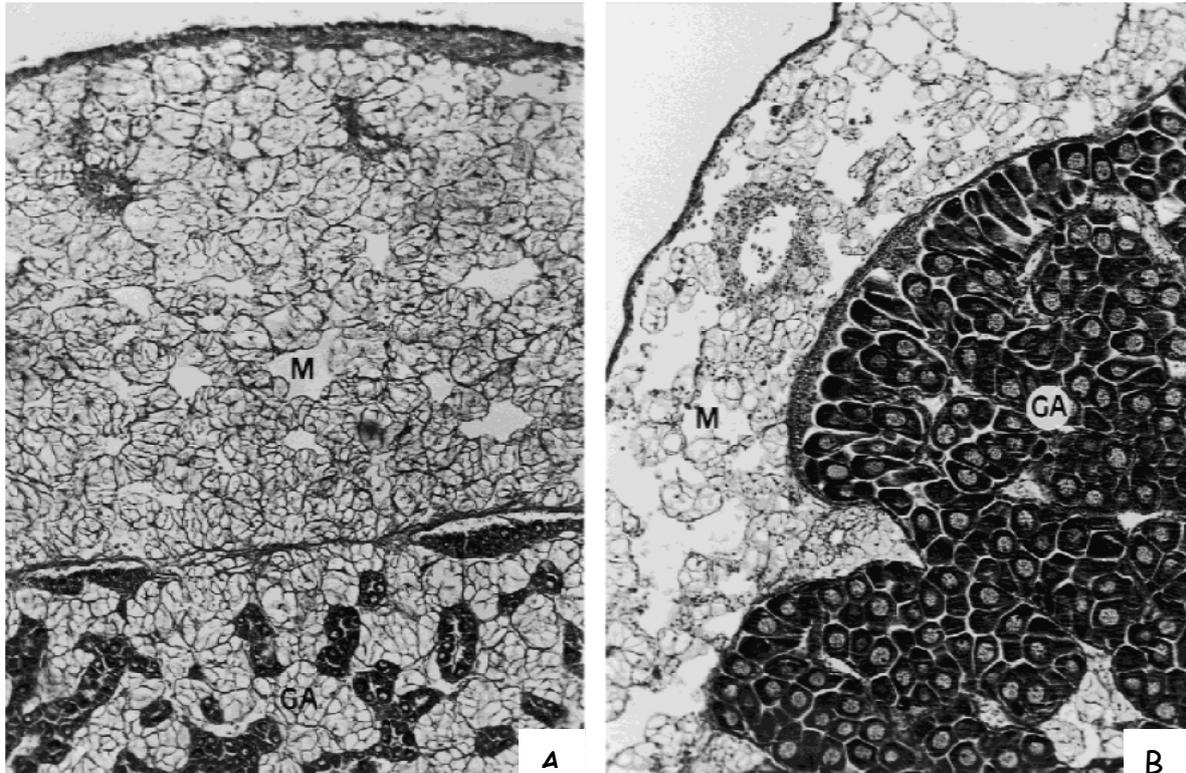


Figure 14 : Variations saisonnières du tissu de réserve dans la région manteau-gonade, d'après Berthelin *et al.*, 2000a.

A : Coupe transversale de la région manteau-gonade (GA) en automne.

B : Coupe transversale de la région manteau-gonade (GA) et du manteau (M) en été.

## 1.7 Le système immunitaire

Les huîtres, comme les autres invertébrés, sont dépourvues d'immunité acquise liée à des cellules « mémoire » conduisant chez les vertébrés à la production d'anticorps ou d'immunoglobulines lors d'une infection. Ainsi, chez l'huître, les mécanismes de défense reposent sur l'immunité dite « innée » ou non-spécifique. Les barrières anatomiques et chimiques constituent la première ligne de défense empêchant les dommages aux tissus, les pertes de fluide et l'invasion par des micro-organismes. Cette ligne de défense est principalement assurée par la coquille, le manteau, les branchies et le mucus (Herpin *et al.*,

2005a). La seconde ligne de défense met en jeu les composants de l'hémolymphe (Canesi *et al.*, 2002), dans laquelle sont trouvés les hémocytes circulants, s'infiltrant dans les tissus, qui constituent les éléments clef de la réponse immunitaire (Xue & Renault, 2001 ; Bachère *et al.*, 2004).

Les populations hémocytaires de l'huître sont représentées par deux principaux types cellulaires : les granulocytes, les hyalinocytes (Figure 15). Peu d'éléments sont connus concernant l'origine et l'ontogenèse des hémocytes chez les mollusques marins. A ce jour, aucun site d'hématopoïèse n'a encore été identifié chez l'huître, et la question même de l'existence d'un organe hématopoïétique différencié reste en suspens (Bachère *et al.*, 2004). Toutefois, il a été suggéré que les hémocytes puissent provenir de la différenciation des cellules du tissu conjonctif (Cheng, 1981).

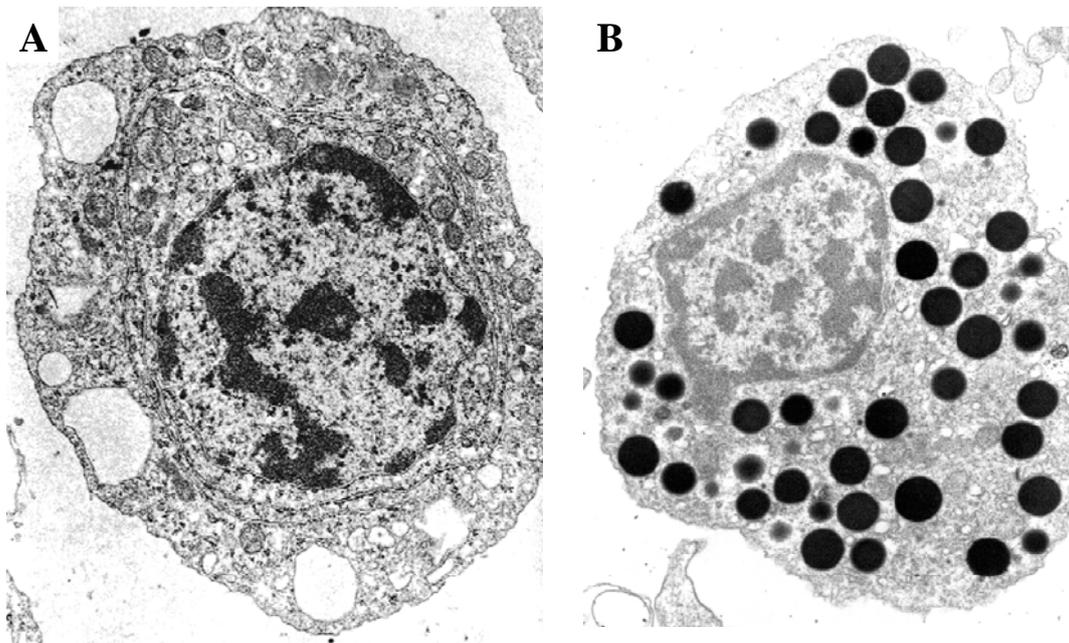


Figure 15 : Les différents types hémocytaires chez *Crassostrea gigas*, identifiés par microscope électronique à transmission, d'après Bachère *et al.*, 2004.

A : Hyalinocytes, B: Granulocytes

Les hémocytes jouent un rôle primordial dans la physiologie de l'huître. En effet, ils participent à de nombreux processus vitaux tels que les réactions de défense, la réparation des lésions, la recalcification de la coquille, le transport des nutriments, la digestion, les processus d'excrétion ou encore la résorption gonadique (Feng, 1988). Ces fonctions reposent en grande

partie sur la capacité des hémocytes à être recrutés sur les sites d'infection ou de lésions, à s'agréger pour restreindre l'infection et à y transporter des éléments essentiels, comme le calcium pour la réparation de la coquille, ou encore les molécules de défense.

Les mécanismes d'implication des hémocytes dans le système de défense se font par des mécanismes de défense à médiation cellulaire, où les hémocytes agissent en tant que cellules immunocompétentes (Canesi *et al.*, 2002 ; Bachère *et al.*, 2004). Ainsi, les hémocytes agissent par phagocytose, lorsqu'un corps étranger (virus, bactéries, particules inorganiques, organismes pathogènes ou non) est détecté au sein ou au contact de l'organisme. Ce processus se déroule en plusieurs étapes :

#### 1) les phases de reconnaissance et de signalisation

La reconnaissance du non-soi par les hémocytes repose sur un système de récepteurs capable de reconnaître des motifs moléculaires conservés caractéristiques des microorganismes. Chez l'huître, plusieurs molécules de reconnaissance ont été identifiées, parmi lesquelles nous pouvons citer les lectines (Olafsen *et al.*, 1992) et les protéines de liaison aux lipopolysaccharides (LPS) (Gonzalez *et al.*, 2005). L'activation de ces molécules de reconnaissance conduit à la mobilisation de voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress et dans la réponse immunitaire, dont la voie Rel/NK- $\kappa$ B, qui régule un nombre important de gènes intervenant dans la réponse inflammatoire (Escoubas *et al.*, 1999 ; Montagnani *et al.*, 2004).

#### 2) l'internalisation du corps étranger

Après l'étape de reconnaissance, le corps étranger est internalisé dans l'hémocyte selon un mécanisme faisant intervenir des phénomènes de remaniement du cytosquelette. Le processus exact demeure assez méconnu à ce jour, mais plusieurs modèles d'internalisation des particules étrangères par les hémocytes des bivalves ont déjà été proposés (Cheng, 2000), pouvant faire intervenir des pseudopodes ou des vacuoles d'endocytose.

#### 3) la dégradation phagocytaire de l'élément phagocyté

Après internalisation des particules étrangères au sein du phagosome, celui-ci fusionne avec les lysosomes pour donner naissance à un phagolysosome. La dégradation des particules étrangères ingérées s'y effectue par la formation d'intermédiaires oxygénés et/ou par la libération de molécules cytotoxiques (Bachère *et al.*, 1995 ; Chu, 2000).

La plupart du temps, la production d'espèces oxygénées réactives (ou ROS pour Reactive Oxygen Species) est couplée à la phagocytose, ou intervient après stimulation des phagocytes par des produits microbiens (Bachère *et al.*, 1991 ; Delaporte *et al.*, 2003 ; Lambert *et al.*, 2003). Cette réaction débute par la réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par la NADPH oxydase, et est associée à une augmentation de la consommation en oxygène par les phagocytes. L'anion superoxyde est alors converti en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxide dismutase (SOD), et également sous forme de radical hydroxyle (OH) ou d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Ces radicaux oxygénés, hautement réactifs et instables, sont microbicides et participent à la destruction des éléments étrangers. Ainsi, la production de ROS constitue une ligne importante de défense contre les pathogènes. Cependant, il a été montré que de trop fortes concentrations de ROS peuvent agir à différents niveaux et induire notamment des phénomènes de peroxydation des lipides, d'oxydation de protéines, de dommages à l'ADN, d'oxydation des glucides et de façon ultime, la mort cellulaire (Manduzio *et al.*, 2005). Afin de limiter ces dommages cellulaires, la production et l'action des radicaux libres oxydants peuvent être contrôlée par des enzymes à activité antioxydante capables de détruire les radicaux libres oxydants, telles que la SOD ou encore la catalase, dont les présences ont déjà été mises en évidence chez l'huître (Boutet *et al.*, 2004 ; Gonzalez *et al.*, 2005).

Ces connaissances de la physiologie de l'animal, résumées succinctement ici, vont donc servir en tant que physiologie « normale » pour aider à la définition d'une physiologie « altérée », perturbée chez l'huître dans le phénomène complexe des mortalités estivales. Bien évidemment, comme précédemment discuté, l'hôte ne constitue qu'une part dans l'interaction conduisant aux mortalités estivales. C'est pourquoi, dans le paragraphe suivant, une synthèse des différents acteurs environnementaux et pathogéniques pouvant intervenir dans ce phénomène complexe est présentée, pour ensuite détailler les connaissances disponibles sur les composantes génétique et physiologique de l'huître dans les mortalités estivales.

## 2. Les mortalités estivales : une interaction entre l'environnement, les pathogènes et l'huître

Comme cela a été présenté précédemment dans l'introduction générale, les résultats issus du programme MOREST ont suggéré l'existence probable d'interactions entre l'environnement, des pathogènes opportunistes et l'huître elle-même, conduisant à la mortalité (Samain & McCombie, 2008). L'implication et les conséquences associées à chacun de ces compartiments ont donc été étudiées afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes et des facteurs impliqués dans ces mortalités.

### 2.1 Les risques liés à l'environnement

Les études réalisées dans le cadre du programme MOREST ont mis en évidence les relations existant entre les mortalités et l'environnement. On parle alors de « risques environnementaux » liés à la température de l'eau, à la pluviométrie, aux ressources trophiques ou encore aux apports sédimentaires, pouvant intervenir directement ou indirectement dans le processus de mortalités de *Crassostrea gigas*.

#### 2.1.1 Le risque thermique

Des conditions extrêmes de température ont parfois été relevées lors d'épisode de mortalité de *C. gigas* (Koganezawa, 1975; Mackin, 1961; Ventilla, 1984). Cependant, cette espèce est largement reconnue pour son excellente tolérance vis-à-vis de l'amplitude thermique. Ces qualités majeures ont d'ailleurs été déterminantes pour placer cette espèce en tant que « leader » mondial de la production d'huîtres.

Les études réalisées sur le paramètre température ont permis de montrer que les phénomènes de mortalité ne sont pas corrélés à l'amplitude thermique maximale : la température absolue ne doit donc pas être considérée comme un facteur direct de mortalité. Cependant, des analyses réalisées sur trois sites « atelier » pendant plusieurs années (en Normandie : baie des Veys, en Bretagne sud : Auray et en Poitou-Charente : Marennes-Oléron) ont permis de montrer que le déclenchement des périodes de mortalités, tant à l'échelle des sites qu'à celle des années, se synchronise de manière remarquable avec la

dynamique thermique. En effet, le retard d'un mois à un mois et demi, systématiquement observé dans le déclenchement des mortalités en baie des Veys par rapport à Marennes Oléron et à la Rivière d'Auray, est à mettre en relation avec le décalage thermique des masses d'eau, pour atteindre le palier des 19°C. Ainsi, il semblerait que le franchissement de ce seuil ouvre une « fenêtre de risque » pour la mortalité estivale.

Cette hypothèse a été renforcée par le fait que ce facteur température peut engendrer des modifications au niveau de la physiologie de l'huître, notamment en terme de gamétogenèse, où le temps nécessaire pour observer un stade particulier de développement de gamète dépend de la vitesse du réchauffement de l'eau (Chavez-Villaba *et al.*, 2003). L'augmentation de la température favorise ainsi le développement gonadique, et donc des dépenses conséquentes en énergie, plaçant l'huître en situation de faiblesse métabolique. Cette faiblesse se traduit par exemple au niveau du métabolisme général, via une consommation d'oxygène élevée pendant cette phase de développement gamétogénétique.

La fenêtre de risque associée au passage des 19°C est donc également illustrée par le lien entre la température et la respiration de l'huître : la consommation d'oxygène de l'huître augmente avec la température (Figure 16), alors que la solubilité de ce gaz dans l'eau de mer diminue. Ainsi, la température augmente les risques d'hypoxie métabolique, altérant le métabolisme énergétique de l'huître.

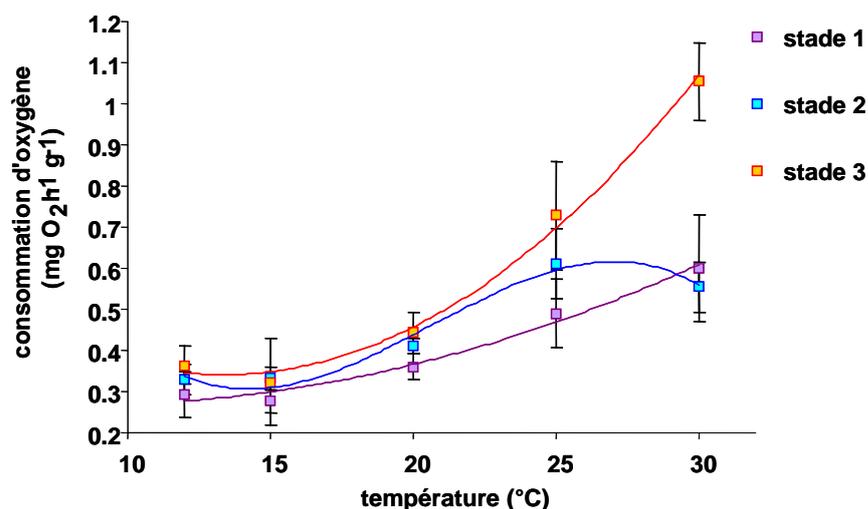


Figure 16 : Respiration moyenne exprimée en mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (moyenne ± erreur standard, n=7) en fonction de la température et du stade de maturation des huîtres. Les stades 1, 2 et 3 représentent des stades visuels du développement gonadique croissant.

D'après Samain & McCombie (2008).

Un impact de la température a également été mis en évidence sur les processus de minéralisation de la matière organique enfouie dans les sédiments, engendrant des augmentations locales de concentration de sulfure et d'ammonium sédimentaire, constituant un facteur de stress aggravant.

Enfin, des études ont montré l'influence de l'augmentation de température sur la croissance des bactéries *Vibrio splendidus* et *Vibrio aesturianus*, et sur l'expression de leurs gènes de virulence, confirmant des résultats préalablement obtenus liant le développement des pathogènes et la température (Johansson *et al.*, 2002). L'élévation de la température favorise également les infections à herpès virus (OsHV-1), très souvent détectées lors des phénomènes de mortalité estivale. Ainsi, que les pathogènes soient d'origine bactérienne ou virale, les analyses montrent que leurs activités métaboliques et leurs pathogénicités sont élevées à partir d'une température seuil.

Il apparaît donc que ce facteur température peut induire plusieurs autres facteurs affectant la survie de l'huître. On ne parlera cependant ici que de conditions cumulatives, qui coïncident avec la température de 19°C, et qui sont nécessaires dans le modèle d'interaction, sans pour autant être suffisants.

### 2.1.2 Le risque pluviométrie

Le « risque pluviométrie » est un risque associé aux apports en eau douce et aux produits associés. Cet apport en eau douce peut être perçu à travers différents descripteurs : (1) la pluviométrie (intensité des précipitations sur le bassin versant); (2) les débits de rivières (flux "entrant" d'eau douce); (3) la salinité, estimateur de "dilution" et d'apports terrigènes au niveau du point de mesure. Sur certains sites ateliers, il a été montré que de fortes corrélations reliaient les taux de mortalité avec les taux de pluviométrie, mais aussi avec les débits moyens annuels des rivières (Figure 17). Ces résultats ont été confirmés par la baisse de salinité accompagnant ces phénomènes, confirmant que l'apport d'eau douce est associé à ces phénomènes.

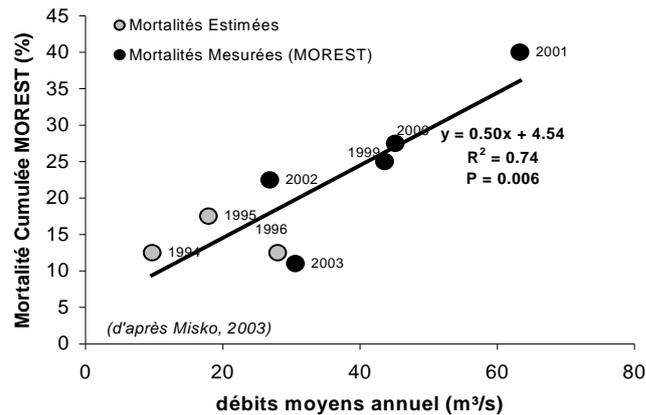


Figure 17 : Relation entre la mortalité estivale cumulée et les débits moyens en baie de Veys des chenaux de Carantan et Isigny (données mortalité huîtres de 2 ans, MOREST + données historiques). D'après Samain & McCombie (2008).

Les risques associés aux apports d'eau douce se traduisent par la modification des écosystèmes des zones ostréicoles, qui requièrent des apports en nutriments équilibrés. En effet, une pluviométrie élevée peut induire une eutrophisation et/ou une efflorescence d'algues toxiques, provoquées par un excès de sels nutritifs (Van Beusekom & De Jonge, 2002), capables d'altérer la physiologie de l'huître. Un fort apport d'eau douce peut également provoquer des déplétions en oxygène, engendrant des situations d'hypoxie, affectant le métabolisme énergétique de l'huître (Cheney, *et al.*, 2001; Cheney, *et al.*, 2000). Enfin, ces apports d'eau douce, provenant en partie des rivières, peuvent drainer des polluants, tels que les herbicides, qui interfèrent sur la qualité de l'environnement nutritionnel, pouvant ainsi fragiliser l'équilibre physiologique de l'huître. En effet, les pesticides présents dans les eaux exercent une pression de sélection sur les espèces des assemblages de populations phytoplanctoniques, favorisant le développement de diatomées et de dinoflagellés potentiellement nuisibles à l'huître.

### 2.1.3 Le risque trophique

Le « risque trophique » découle de l'influence des variations quantitatives et qualitatives de nourriture sur les taux de mortalités estivales. En effet, il a été montré dans certains cas, qu'un apport trophique élevé d'un point de vue quantitatif, mesuré via la croissance en poids de l'huître ou la mesure des taux de chlorophylle a, pouvait être corrélé à des taux élevés de mortalité. Cet effet est à rapprocher de l'influence que peut avoir la

ressource trophique sur la reproduction, l'investissement reproductif étant augmenté en conditions nutritives élevées (Myrand *et al.*, 2000 ; Barillé *et al.*, 1997 ; Raillard *et al.*, 1993).

Cependant, la relation entre forte disponibilité en nourriture et mortalité n'a pas été systématiquement observée dans les cas analysés, laissant supposer que le risque trophique dépend également de la qualité des ressources trophiques. En effet, il existe un grand nombre d'espèces de dinoflagellés et de diatomées, dont le développement peut être lié au risque « pluviométrie » développé précédemment, qui sécrètent des biotoxines. Ces substances sont potentiellement nuisibles pour les organismes aquatiques exposés (Landsberg, 2002), en altérant par exemple les paramètres hémocytaires (Wikfors, 2005). Des exemples illustrent ce phénomène (en Bretagne sud, 1998 et 2003) où des mortalités d'huîtres ont suivi la fin d'un bloom important de la diatomée *Cerataulina*, associé à une importante production de mucus, qui aurait obstrué les branchies des filtreurs (Taylor, *et al.*, 1985).

#### 2.1.4 Le risque sédimentaire

Sur de longues périodes, la tendance est à l'envasement progressif des baies, estuaires et bassins (Figure 18). Par exemple, le bassin de Marennes Oléron a vu son volume réduit de 20% environ entre 1824 et 1995, avec une accélération importante depuis 1970 (Bertin, *et al.*, 2004).



Figure 18 : Phénomène d'envasement de zone ostréicole.

Le risque zootechnique lié à la présence de ce sédiment a été identifié puisque la mortalité estivale des élevages "à plat" ou à proximité du sédiment (quelques cm), peut être significativement supérieure de 15-20% par rapport à celle des élevages sur tables ostréicoles

(élévation de 50 à 70 cm par rapport au sol) (Figure 19) (Gagnaire, *et al.*, 2006; Soletchnik, *et al.*, 1999) : on parle donc « d'effet sédiment ». Cette influence de la proximité du sédiment est perceptible quel que soit le stade de maturation des cheptels en élevage, et peut contribuer jusqu'à 20% de la variabilité totale de la mortalité (Soletchnik *et al.*, 2005).

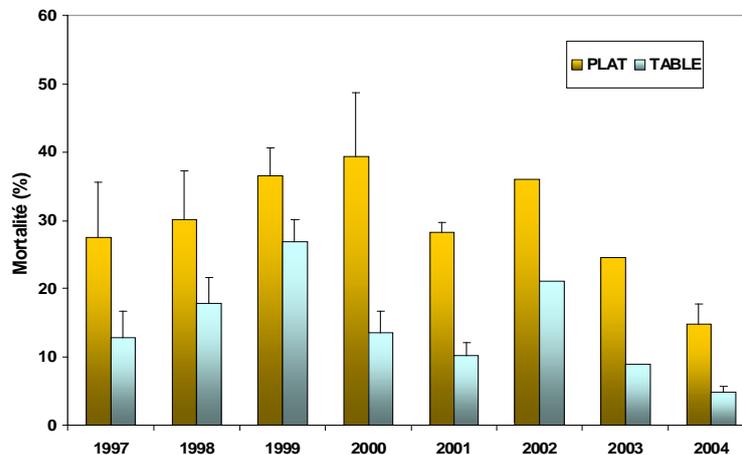


Figure 19 : Mortalité comparée entre les élevages à 0-15 cm (plat) et 50-70 cm (table) sur le site atelier de Perquis dans le sud du Bassin de Marennes Oléron. D'après Samain & McCombie (2008).

Il a été mis en évidence, sur différents sites « atelier », l'apparition à l'intérieur du sédiment de « poches » de concentrations importantes de sulfures et d'ammonium, qui se rapprochent de l'interface eau-sédiment pendant la période de montée thermique et d'apparition des phénomènes de mortalité. L'existence du noyau d'ammonium et de sulfures qui se développent dans le sédiment est cohérente avec un processus de dégradation de la matière organique accumulée pendant les mois précédents. Il s'intensifie avec l'élévation progressive de la température du mois de mars jusqu'au mois de juin. Les modifications induites par l'évolution de cette « poche » trouvent leur traduction dans un flux d'azote ammoniacal à l'interface eau-sédiment qui pourrait favoriser dans un premier temps l'apparition d'un bloom de phytobenthos. Dans ce scénario, l'apparition de la forme toxique  $\text{NH}_3$  dans le milieu basique induit par ce bloom pourrait provoquer la chute de ce dernier et l'apparition d'une crise dystrophique (Soletchnik *et al.*, 2005).

Ainsi, le risque sédimentaire proviendrait de son rôle de piège pour la matière organique générée par les pluies via les apports des bassins versants, diffusant alors des produits de reminéralisation anaérobie. Les risques pluviométrique et sédimentaire pourraient donc avoir ici un dénominateur commun. Les stress générés par ces facteurs,

associés aux conditions particulières de l'huître en période de reproduction, pourraient constituer un élément déterminant dans l'induction d'épisodes de mortalité.

Les précédentes analyses mettent en évidence que la température, considérée seule, agit comme catalyseur de multiples processus biologiques à différentes échelles de temps. En effet, l'apparition des mortalités semble liée au franchissement du seuil des 19°C, et, sans que la température soit directement impliquée comme agent causal dans la mortalité, elle en règle par contre parfaitement la chronologie. Les études ont également clairement identifié des facteurs environnementaux aggravants, pouvant participer à l'apparition et/ou à l'intensité de ces phénomènes de mortalité.

Ainsi, on parlera d'un « risque environnemental combiné » dans lequel la température règle des processus chimiques pouvant provoquer des déséquilibres environnementaux, mais aussi des processus biologiques potentiellement associés à des déficits énergétiques. Ces facteurs peuvent ensuite induire le stress déclencheur des épisodes de mortalité de *C. gigas*, et notamment une sensibilité accrue des huîtres aux pathogènes présents dans le milieu.

## 2.2 Les risques liés aux pathogènes

L'un des objectifs principaux des travaux en pathologie était d'identifier et d'étudier des agents infectieux capables d'induire des maladies et des mortalités chez *C. gigas*. Les principales maladies des espèces proches sont dues à des parasites comme *Haplosporidium nelsoni* (Ford & Haskin, 1987) et *Perkinsus marinus* (Oliver et al, 1998) pour *Crassostrea virginica*, *Marteilia sydneyi* et *Mikrocytos roughleyi* pour *Saccostrea commercialis* (Hine, 1996) ou à des virus, comme l'*iridovirus* chez *C. angulata*. Cependant, ces parasites n'ont pas été détectés chez *C. gigas*. La maladie pouvant se rapprocher des mortalités estivales est la JOD (Juvenile Oyster Disease) chez *C. virginica* dans laquelle les conditions environnementales jouent un rôle majeur mais où l'agent causal, une bactérie (*Roseovarius crassostrea*) est encore controversé (Ford & Borrero, 2001 ; Boettcher et al, 2000).

Les différentes analyses ont montré qu'aucun agent pathogène particulier ne semble être associé de manière systématique aux épisodes de mortalités estivales. Cependant, des bactéries du genre *Vibrio* (Lacoste *et al.*, 2001a ; Le Roux *et al.*, 2002, Paillard *et al.*, 2004) ainsi qu'un virus de type herpès (Renault *et al.*, 1995) ont pu amplifier certaines mortalités d'huîtres creuses, comme cela a été le cas durant l'été 2008 (T. Renault, com. pers.). Ces observations laissent donc penser que les mortalités estivales ne correspondent pas à une épizootie faisant intervenir un agent infectieux unique mais plutôt différents agents pathogènes associés à ce phénomène.

### 2.2.1 L'herpès virus OsHV-1

Le virus de type herpès a été signalé la première fois chez l'huître *C. virginica* par Farley *et al.*, (1972). Ensuite, de fortes mortalités d'huîtres *C. gigas* (de 80 à 90%), observées dans le milieu naturel au cours des étés 1993, 1994 et 1995, ont pu être associées à la détection d'un virus de type herpes nommé OsHV-1 pour Ostreid Herpes Virus type 1 (Renault *et al.*, 1995 ; Renault *et al.*, 2000, Renaut & Novoa, 2004) (Figure 20). Sa pathogénicité a été démontrée par infection expérimentale de larves *C. gigas* en culture axénique (Le Deuff *et al.*, 1994), provoquant des lésions associées à des infiltrations hémocytaires. Il a également été mis en évidence l'existence d'une transmission verticale de ce virus OsHV-1. Par ailleurs, des géniteurs mâles positifs pour la détection d'ADN viral semblent donner des élevages larvaires présentant des performances zootechniques bien

inférieures à ceux provenant de géniteurs indemnes. Enfin, il est suspecté que les femelles porteuses du virus OsHV-1 transmettent aux larves des facteurs qui favorisent une protection de la descendance vis-à-vis de l'infection virale (Barbosa-Solomieu et al, 2004).

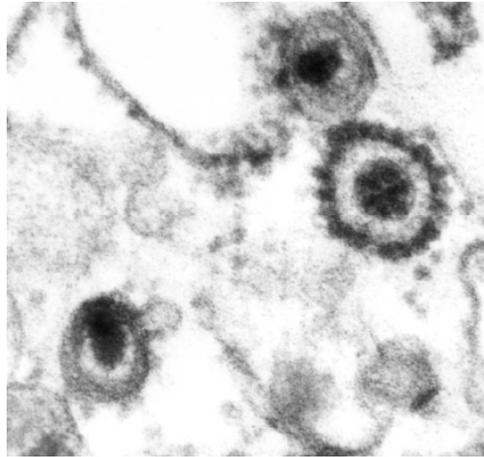


Figure 20 : Particules d'un herpes virus « OsHV-1 » observées à partir de larves *C. gigas*.  
D'après Renault & Novoa (2004).

L'herpès virus-like de l'huître *C. gigas* (OsHV-1) a été mis en évidence dans environ 40% des 136 lots étudiés dans le cadre du réseau REPAMO (Réseau de Pathologie des Mollusques) entre 2001 et 2005. Ces lots provenaient de différents sites du littoral français (gisements naturels ou élevage) ayant été touchés par des mortalités « anormales », c'est-à-dire affectant plus de 15% d'un stock dans un intervalle maximal de 15 jours. Cet herpes virus a été essentiellement détecté entre les mois de mai et août, et plus particulièrement pendant le mois de juillet. La détection du virus semble ainsi liée à l'augmentation progressive des températures et se superpose à l'apparition des mortalités (Figure 21). Concernant les fortes mortalités estivales observées durant l'été 2008, les analyses réalisées sur sept sites fortement affectés ont mis en évidence la détection du virus OsHV-1 dans plus de 75% des cas (T. Renault, com.pers.).

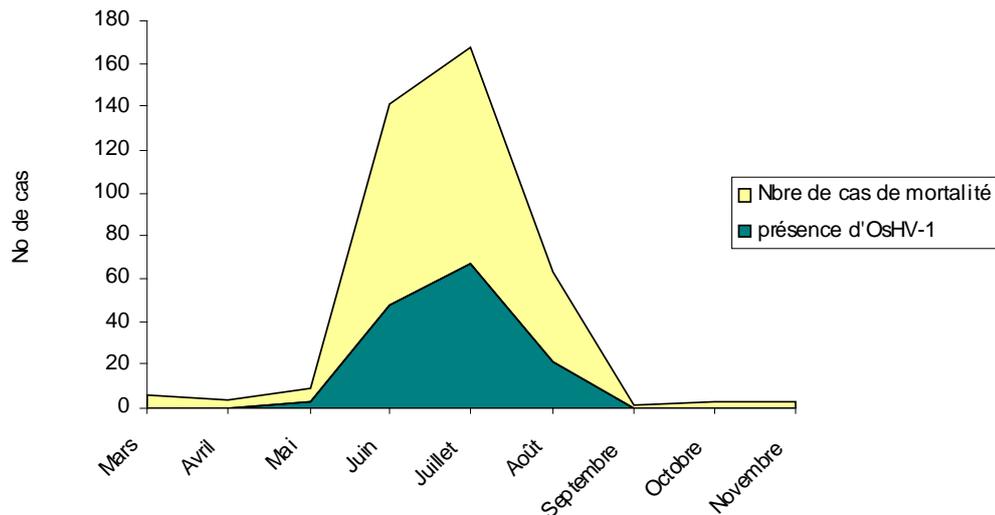


Figure 21 : Détection d’Herpès OsHV-1 et cas de mortalité de naissain déclarés de 2001 à 2005.  
D’après Samain & McCombie (2008).

Ainsi, les divers examens des huîtres en cours de mortalités en période estivale par différentes techniques (histologie, bactériologie, virologie moléculaire) indiquent que l’herpès virus OsHV-1 est fréquemment détecté chez des huîtres de moins d’un an, lors des montées de température, mais il n’explique pas toutes les mortalités de naissain. Récemment une observation similaire a été faite aux Etats-Unis (Friedman *et al.*, 2005). Ces auteurs concluent à l’implication de l’herpès virus dans certaines des mortalités estivales quand la température dépasse 24°C.

### 2.2.2 Les bactéries *Vibrio*

Les bactéries *Vibrios* associées aux huîtres ont été isolées dans différents épisodes de mortalité. Le pouvoir pathogène de ces bactéries vis-à-vis de l’huître est parfois difficile à mettre en évidence, car ces bactéries peuvent faire partie de la flore microbienne commensale du tube digestif et de l’hémolymphe (Prieur, 1982). Cependant, lorsque les concentrations sont anormalement élevées, le pouvoir pathogène de ces bactéries se traduit par une nécrose des tissus, une perturbation de l’alimentation et de la croissance des larves (Lodeiros *et al.*, 1987).

Des souches bactériennes de *Vibrio splendidus* (Lacoste *et al.*, 2001a ; Le Roux *et al.*, 2002) et de *Vibrio aesturianus* (Labreuche, 2006) ont pu être identifiées chez des huîtres affectées par les mortalités estivales : ces souches, détectées tout au long des années, l’ont été plus particulièrement au printemps et en été, au moment des mortalités. Des études ont montré

que l'action des bactéries *V. aesturianus* se fait via l'action d'Extra Cellular Products (ECP), associés entre autres, à l'apparition d'une métallo-protéase dans l'hémolymphe (Labreuche, 2006). Cette métallo-protéase montre une forte activité protéasique et un effet léthal sur les huîtres, confirmant ainsi l'implication majeure de cette toxine dans les mécanismes d'infection. En ce qui concerne les bactéries *V. splendidus*, le séquençage complet de cette bactérie a récemment été réalisé (<https://www.genoscope.cns.fr/agg/mage/>). Les études d'annotation des gènes constituant ce génome ont permis d'identifier les gènes de virulence possibles, représentés entre autres par un gène de la métallo-protéase, un gène de phospholipase, ou encore des opérons codant pour la biogenèse de capsule, ou pour l'adhésion/mobilité des enzymes extracellulaires.

Enfin, des études ont montré que les mortalités des huîtres traitées avec l'antibiotique chloramphénicol ont fortement diminué pour atteindre une différence de mortalité de 60% avec les huîtres sans antibiotiques au bout de 6 jours de traitement (Figure 22). Cependant, une mortalité résiduelle a encore persisté jusqu'à la fin de l'expérience dans le lot traité. Il ne peut s'agir d'une moindre efficacité de l'antibiotique puisque *Vibrio aestuarianus* présent dans les huîtres moribondes du lot témoin ne l'était pas dans les huîtres du lot traité. Ces travaux laissent donc ouverte la question de l'association de plusieurs facteurs (en plus des bactéries) : soit un autre agent pathogène (bactérie résistante au traitement antibiotique ou un virus ...), soit un état physiologique de l'huître particulièrement affaibli pendant cette période.

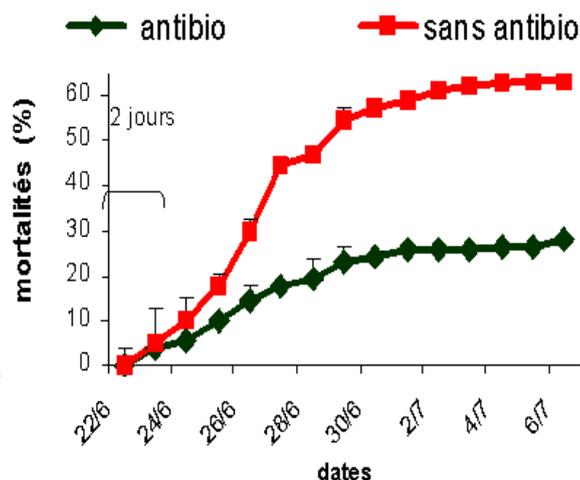


Figure 22 : Mortalités cumulées observées sur des huîtres traitées ou non par un antibiotique (chloramphénicol). D'après Samain & McCombie (2008).

### 2.2.3 Les conditions nécessaires à l'expression d'une infection

Les différents essais d'infection réalisés (baignade avec des cultures de bactéries, jeûne puis baignade avec des co-cultures de bactéries et algues alimentaires, cohabitation d'huîtres injectées avec des huîtres sentinelles) ayant donné des résultats aléatoires, l'importance de l'effet de l'état physiologique particulier de l'huître et/ou d'un stress environnemental sur la susceptibilité à l'infection a été envisagé. En effet, des expériences ont permis de montrer que la susceptibilité des huîtres à des *Vibrios* est augmentée lorsqu'elles sont placées dans des conditions stressantes (Lacoste *et al.*, 2001b). Ces résultats suggèrent donc que les changements physiologiques de l'huître liés au stress puissent influencer les interactions « hôte-pathogènes » et augmenter leur vulnérabilité face aux *Vibrios*.

Ainsi, l'examen des huîtres en cours de mortalité en période estivale par différentes techniques (histologie, bactériologie, virologie moléculaire) indique qu'un même et unique pathogène n'est pas systématiquement détecté lors de phénomènes de mortalités estivales. Par ailleurs, la virulence des agents pathogènes identifiés est médiée par des facteurs environnementaux qui leur sont favorables (matière organique, température), mais aussi par l'état physiologique de l'animal. En effet, des huîtres affaiblies notamment par une maturation intense et par des conditions stressantes seraient alors plus sensibles à l'attaque de ces pathogènes.

## 2.3 Les risques liés à l'hôte

Les études des facteurs de risques associés à l'environnement et aux pathogènes laissent supposer que leurs impacts au niveau de la mortalité estivale ne se traduisent que dans certaines conditions. Il a été établi qu'un affaiblissement physiologique de l'huître était « nécessaire » pour que ces facteurs interagissent dans l'apparition des mortalités. Plus particulièrement, les conséquences associées à la période de reproduction et aux conditions environnementales stressantes observées pendant la période de mortalité, semblent avoir des répercussions sur le métabolisme général de l'huître, pouvant ainsi la placer dans une situation de « détresse physiologique » la rendant plus sensible. De plus, des études réalisées dans le cadre du programme MOREST ont mis en évidence l'existence d'une composante génétique aux variations observées pour la résistance des huîtres aux mortalités estivales. Ceci a permis d'obtenir des souches plus ou moins sensibles à la mortalité estivale, présentant des différences au niveau de plusieurs processus physiologiques.

Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps les travaux montrant l'existence d'une composante génétique à la survie estivale. Dans un second temps, les différents processus physiologiques de l'huître suspectés d'être impliqués dans l'interaction conduisant à la mortalité seront détaillés.

### 2.3.1 Une base génétique liée à la survie du naissain

Afin de mettre en évidence l'éventuelle existence d'une base génétique du naissain en période estivale, un protocole expérimental de génétique quantitative a été mis en œuvre sur plusieurs générations. L'objectif était de déterminer si la survie du naissain de l'huître creuse en période estivale est héritable et donc sélectionnable.

Afin de produire la première génération G1, 300 huîtres, issues de captage naturel de Seudre, ont été échantillonnées en novembre 2000 dans le bassin de Marennes-Oléron. Ces huîtres ont été maturées selon les conditions habituelles d'écloserie et reproduites aux cours de 3 séries successives de croisements. L'écloserie de La Tremblade disposant d'une unité homogène de 24 bacs d'élevage larvaire de 30 litres, 3 séries de croisements successifs ont été réalisées les 05 février 2001, 05 mars 2001 et 18 avril 2001 respectivement pour les séries 1, 2 et 3. Pour chaque série, 6 mâles ont été utilisés et chaque mâle a été croisé avec quatre

femelles afin d’obtenir 6 familles de demi-frères et 24 familles de plein-frères (les mâles et les femelles étant choisis aléatoirement dans la population G0). Ce type de plan de croisements permet de calculer les paramètres génétiques (héritabilité et corrélations) et de distinguer la variance génétique additive. La variance phénotypique est alors séparée en composantes d’observations attribuables :

- aux différences entre les enfants des différents mâles (composante inter-mâle)
- aux différences entre les enfants des femelles accouplées au même mâle (composante inter-femelle et intra-mâle)
- aux différences entre les enfants d’une même femelle (composante intra-femelle)

Pour chaque série de croisements, un témoin d’éclosion nommé ‘pool’ a été produit avec les géniteurs ayant servi à l’élaboration des 24 familles de la série correspondante.

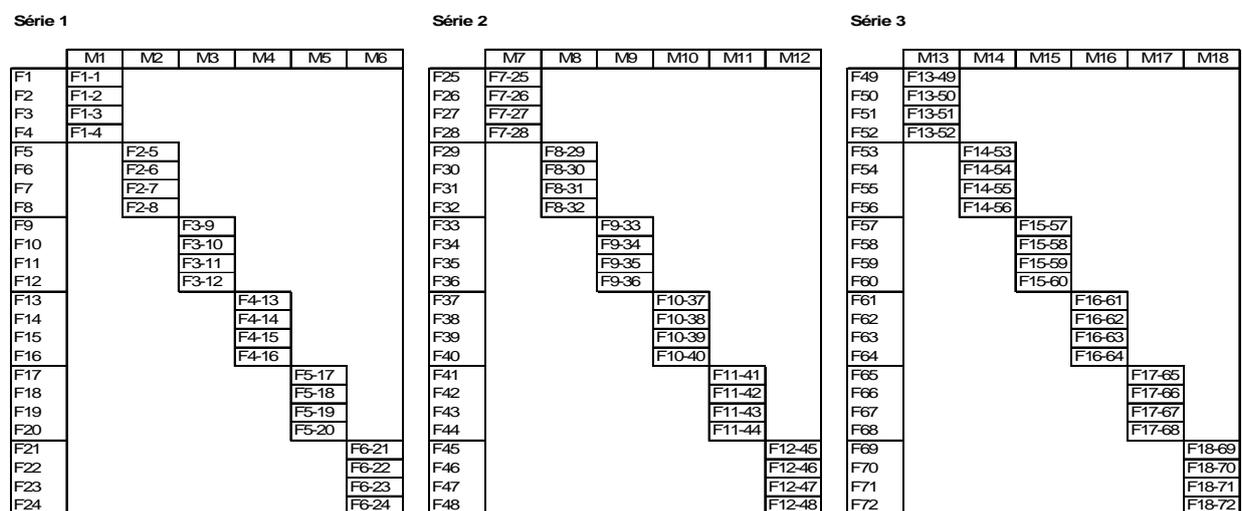


Figure 23 : Plan de croisement hiérarchisé par les mâles des 3 séries pour la constitution des familles de 1<sup>ère</sup> génération. D’après Samain & McCombie (2008).

A l’issue de la période d’élevage larvaire, chaque famille a été fixée sur micro-brisure de coquille d’huître. Les naissains d’une taille d’environ 2 mm, ont ensuite été transférés à la nurserie de Bouin pour grossissement. A J129, J115 et J102 respectivement pour les séries 1, 2 et 3, chaque lot a été tamisé sur une grille de 8 mm pour éliminer les individus ayant une taille inférieure à la maille, et conserver les individus retenus par la maille pour la mise en élevage sur estran. A la fin de la période de micro-nursage, 13, 18 et 18 familles respectivement pour les séries 1, 2 et 3 présentaient des effectifs suffisants pour le protocole envisagé. Il a donc été décidé de ne conserver que 15 familles bi-parentales pour les séries 2

et 3 pour l'expérience de la caractérisation sur estran des cheptels. Ainsi, 43 familles de plein-frères réparties en 17 familles de demi-frères ont été testées dans chaque site.

La caractérisation sur estran des familles a été réalisée dans un dispositif multi-sites composé de 3 sites ateliers : Ronce Perquis (« Ronce » dans le Bassin de Marennes-Oléron), Rivière d'Auray (« RA » en Bretagne sud) et Baie des Veys (« BDV » en Normandie). Les cheptels ont été disposés sur site à raison de 9 demi-poches par famille et par site contenant chacune 150 individus, et une poche de réserve contenant environ 1000 individus. Le poids total des 150 individus a été mesuré pour chaque poche lors de la mise sur site (P0), et une pesée individuelle de 200 individus par famille a été réalisée.

Pour chaque site, 3 prélèvements de 3 demi-poches ont été effectués deux semaines (P1) et un mois (P2) après la mise sur site, et un point final (P3) a eu lieu début octobre 2001. Au final, le naissain a été élevé sur estran 104, 89 et 56 jours pour les séries 1, 2 et 3 respectivement. Les huîtres vivantes et mortes ont été comptées lors des 3 prélèvements, et une pesée totale du naissain vivant a été effectuée pour toutes les demi-poches.

Afin de réaliser la seconde génération, la meilleure et la plus mauvaise des familles de demi-frères pour chaque série G1 ont été retenues pour une expérience de sélection divergente sur la survie au stade naissain. Les familles sélectionnées n'ayant pas ou peu subi les mortalités estivales de 2001 ont été dénommées familles « Résistantes », ou 'R', et les familles sélectionnées comme ayant présentées des mortalités importantes en 2001 ont été appelées familles « Sensibles » ou 'S'.

Pour chaque famille G1 sélectionnée, 500 individus ont été conservés à la nurserie de Bouin pour grossissement intensif afin d'obtenir des animaux aptes à se reproduire dès l'âge de 9 mois. Ces animaux, indemnes de toute mortalité, ont été mis en élevage sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron de fin septembre à mi-janvier. Début janvier 2002, aucune mortalité n'ayant été constatée, 60 individus par lot ont été conditionnés pour reproduction générant les familles « G2R » et « G2S ». Chaque famille a été obtenue par le croisement d'une moyenne de 25 mâles et 25 femelles de chaque famille G1 sélectionnée afin de représenter au mieux leur valeur génétique. Des lots témoins diploïdes (G2t2n) ont été réalisés à partir des pools de la G1 (croisements inter-série de manière à éviter toute consanguinité). Un lot triploïde (G2t3n) a également été constitué à partir d'un croisement entre des femelles des pools 1, 2 et 3 avec trois mâles tétraploïdes. D'autre part, ces mêmes familles G1 ont été reproduites en consanguinité (intra famille de plein-frères et de demi-frères) générant les familles « G2cR » et « G2cS ».

Les résultats (explicités dans Samain et McCombie, 2008) ont ensuite permis de tester la répétabilité de la réponse à la sélection et des estimations des paramètres génétiques observées en seconde génération, en produisant une troisième génération 2003. Ainsi, de manière similaire aux générations précédentes, 500 huîtres par lot G2 ont été gardées indemnes de toute mortalité dans la nurserie de Bouin puis transférées sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron en octobre 2002. Soixante huîtres par lot ont été conditionnées pour leur reproduction. Trois types de croisements ont été réalisés. Les lots G3R et G3S ont été obtenus par croisement des G2cR et G2cS. Chaque croisement a été réalisé dans les deux sens possibles (mâles x femelles et femelles x mâles) avec une moyenne de 23 mâles et 23 femelles par lot parental G2c. Les femelles utilisées pour produire les lots G3S et G3R ont également été croisées avec 3 mâles tétraploïdes, générant respectivement les lots triploïdes G3S3n et G3R3n. Des témoins triploïdes et diploïdes ont également été générés en croisant des femelles diploïdes sauvages avec les 3 mâles tétraploïdes (lot G3t3n) ou des mâles diploïdes sauvages (lot G3t2n). Des croisements intra-lots (donc générant de la consanguinité) ont également été réalisés. Une moyenne de 12 mâles et 12 femelles a été utilisée pour chaque lot G2R, G2S, G2cR et G2cS, générant respectivement les lots consanguins G3cR, G3cS, G3c<sup>2</sup>R et G3c<sup>2</sup>S (c<sup>2</sup> indiquant 2 générations successives de consanguinité). Des huîtres sauvages ont été utilisées pour produire les lots témoins respectifs G3ct et G3c<sup>2</sup>t.

Pour les lots G3, les protocoles d'élevage larvaire, de micronurserie et de nurserie utilisés pour G1 et G2 ont été appliqués à l'identique. Le testage sur estran des lots G3R et G3S et les témoins diploïdes et triploïdes (G3t3n, G3t2n, G3S3n et G3R3n) n'a été réalisé que sur le site RA alors que les lots G3cR, G3cS, G3c<sup>2</sup>R et G3c<sup>2</sup>S et leur témoin n'ont été testés que sur le site de Ronce pendant l'été 2003.

De façon identique à la troisième génération (2003), une nouvelle génération a été produite en 2004 et à nouveau en 2005 et testée sur estran. Cette génération avait également pour but de « conserver » les lignées consanguines afin de pouvoir continuer de produire des lots R et S pour des expérimentations futures. De manière similaire aux générations précédentes, 500 huîtres par lot G3c2 ont été conservées indemnes de toute mortalité dans la nurserie de Bouin puis transférées sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron en octobre 2003. Soixante huîtres par lot ont été conditionnées pour leur reproduction en 2004 et en 2005. En 2004, les croisements ont été réalisés en juillet à l'écloserie d'Argenton. En 2005, les croisements ont été réalisés en mars à l'écloserie de La Tremblade. Deux types de lots ont été produits. Les croisements inter-lignées G3c2 ont générés, en 2004 et 2005, des lots non



être en relation avec une ou des fonctions de l'huître impliquée(s) dans le différentiel de survie observé entre R et S. Ainsi, la mise en évidence de réponses physiologiques différentes entre les huîtres R et S peut laisser supposer que ces mécanismes sont impliqués dans les phénomènes associés à la mortalité.

### 2.3.2 La physiologie de l'huître : une composante des mortalités estivales

Parmi les processus physiologiques potentiellement liés aux mortalités estivales, il semblerait que la reproduction, la gestion du métabolisme énergétique, l'immunité et enfin la réponse au stress induit par les conditions environnementales, jouent un rôle particulièrement important. L'analyse de ces fonctions physiologiques pendant la période critique, et les différences qu'elles peuvent présenter selon des souches Résistantes et Sensibles sont abordées dans les paragraphes suivants.

#### 2.3.2.1 La période de reproduction

La reproduction de l'huître creuse *C. gigas* apparaît comme une fonction extrêmement plastique. Les différentes étapes du cycle de la gamétogenèse, de l'initiation à l'émission des gamètes, peuvent en effet être modifiées en intensité et durée, en fonction des facteurs environnementaux tels que l'abondance trophique et la température (Enriquez-Diaz, 2004 ; Fabioux et al, 2005). Chez cette espèce, le cycle de reproduction varie donc en fonction des sites d'élevage et des années, au même titre que les phénomènes de mortalités, plus précoces ou plus tardifs dans la saison, plus intenses ou plus réduits en fonction des sites ou des années.

La période de reproduction associée à la période estivale correspond à deux processus clefs : la gamétogenèse et l'émission des gamètes. Des études ont montré que cette période de reproduction se traduit par une dépense métabolique croissante, évaluée par la mesure de sa consommation en oxygène, au fur et à mesure du développement de la gonade. Ces résultats concordent avec ceux de Deslous-Paoli *et al.* (1981) indiquant que l'huître doit consacrer une très grande partie de son énergie à la reproduction afin de produire une gonade pouvant représenter jusqu'à 80% de son poids.

D'autres expérimentations ont montré que l'émission des gamètes constitue une phase coûteuse en terme énergétique, traduite par une augmentation accrue de la consommation en

oxygène (Figure 25). Ce phénomène de ponte est également associé à un arrêt de l'alimentation et un surcroît du métabolisme, probablement dû à l'activité valvaire accrue lors de l'expulsion des gamètes (Bourlès, 2004). Ainsi, au cours de la ponte, les besoins métaboliques augmentent de près de 50% pendant au moins 36 heures, ce qui constitue sans nul doute un stade « critique » en terme énergétique (Bourlès, 2004).

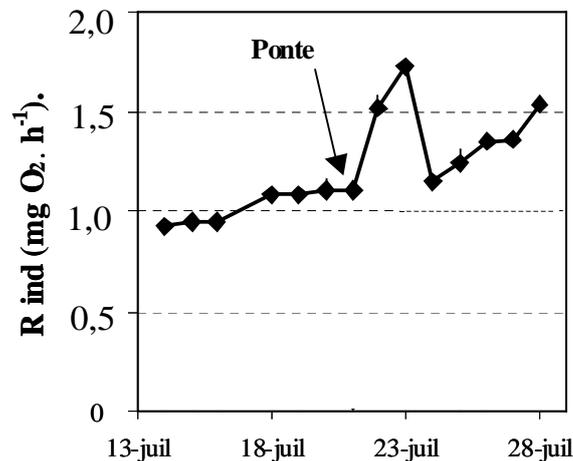


Figure 25 : Evolution de la respiration au cours de la ponte.  
D'après Samain & McCombie (2008).

Ainsi, les forts besoins métaboliques associés à la période de développement gamétogénétique et aux pontes laissent supposer que la période de reproduction représente une phase extrêmement coûteuse pour l'huître.

De plus, des études réalisées dans le cadre du programme MOREST ont permis de montrer l'existence d'un lien très marqué entre l'intensité de la gamétogenèse et les mortalités. Ces résultats sont supportés par le fait que les huîtres R et S, qui diffèrent en terme de mortalité, diffèrent également en terme de comportement reproducteur. En effet, il a été mis en évidence des investissements plus importants des huîtres S en terme de proportion de gonade, durant la phase de maturation, par rapport aux huîtres R, et ce surtout en milieu trophique riche (Enriquez-Diaz *et al.*, 2003 ; Samain *et al.*, 2007).

De fait, ces résultats mettent en évidence l'influence de la reproduction sur l'état physiologique de l'huître. Les fortes demandes métaboliques associées au développement de la gonade en été justifient donc l'étude des bilans énergétiques associés à cette période.

### 2.3.2.2 La gestion des réserves et le bilan énergétique

Etant donné les forts besoins métaboliques engendrés par la période de reproduction, il était intéressant d'étudier si la gestion des réserves pendant cette période s'en trouvait modifiée. D'une façon générale, au cours d'un cycle de reproduction, les paramètres énergétiques des huîtres varient selon trois phases (1) stockage de réserves de l'automne au printemps (2) consommation des réserves stockées pendant la gamétogenèse active et (3) restauration du tissu de réserves pendant la résorption du tissu gonadique (Heude-Berthelin, 2000).

Les résultats montrent que pendant la période de gamétogenèse active (d'avril à juillet), le développement du tissu gonadique s'accompagne d'une consommation en glucides (Figure 26) représentative d'une utilisation intense des réserves en sucres. Cette consommation d'énergie se répercute jusqu'au niveau du stock cellulaire d'ATP avec une diminution des valeurs de charge énergétique adénylique (AEC). Ainsi, les faibles valeurs estivales de l'AEC des huîtres suggèrent qu'elles sont physiologiquement très affaiblies, voire dans une situation de stress (Ivanovici, 1980). Ces résultats se traduisent également au niveau de l'étude du bilan énergétique de l'huître (Scope For Growth), qui, étant associé à une diminution de l'efficacité d'absorption (fraction de nourriture digérée et absorbée par rapport à la fraction ingérée), devient négatif pendant cette période de reproduction (Figure 27).

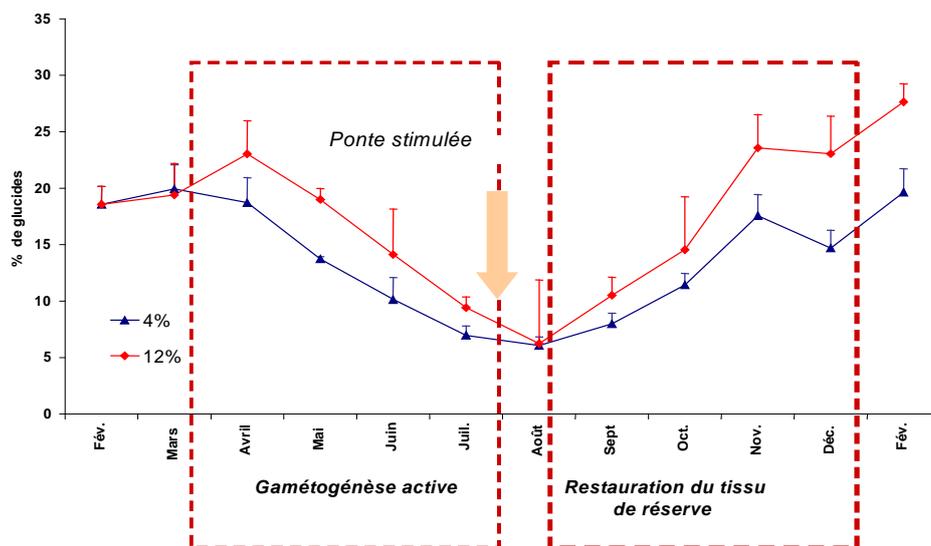


Figure 26 : Evolution du taux moyen de glucides (% de poids sec, moyenne + SD, n=3) chez des huîtres conditionnées en milieu contrôlé pendant un an et soumises à deux régimes alimentaires CN1 et CN3 (4 et 12% de poids sec d'algue par gramme de poids sec d'huître et par jour). D'après Delaporte *et al.*, 2006a.

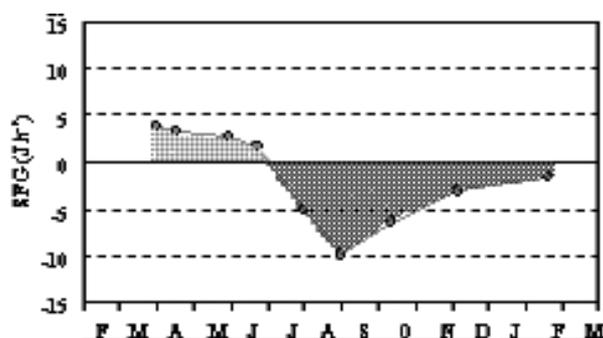


Figure 27 : Evolution du bilan énergétique (calcul du « scope for growth », valeur moyenne, SE non calculable) d'une huître creuse au cours de la gamétogenèse.

D'après Samain & McCombie (2008).

Les variations métaboliques associées à la période critique ont également été analysées via la comparaison des données d'expression d'enzymes clés du métabolisme des glucides, entre des huîtres R et S. Pour cela, les enzymes clés du métabolisme glucidique, à savoir l'hexokinase (HK), la glycogène synthase (GS), la glycogène phosphorylase (GP), la pyruvate kinase (PK), la phosphoglucomutase (PGM), et la phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK) ont été analysées en période critique.

Les résultats montrent une nette différence de niveau d'ARNm entre les huîtres R et S pour les enzymes HK, PGM et PEPCK (Figure 28) et aucune différence significative pour les autres enzymes.

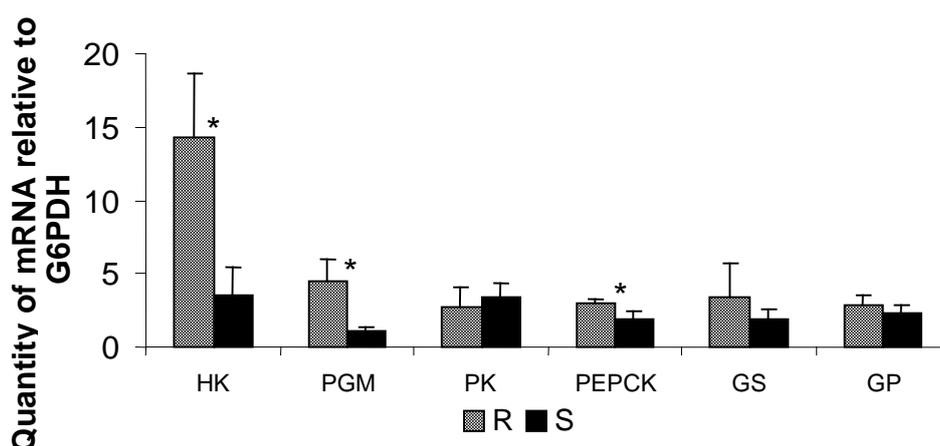


Figure 28 : Quantité d'ARNm de Hexokinase (HK), Phosphoglucomutase (PGM), Pyruvate kinase (PK), Phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK), Glycogen Synthase (GS), et Glycogen Phosphorylase (GP) chez les huîtres Résistantes R (barre hachurée) et Sensibles S (barre noire) au cours de la période de reproduction. D'après Samain *et al.*, 2007.

Ces résultats suggèrent que les flux énergétiques (pour la partie glucidique) et leur gestion peuvent être différents entre R et S en période estivale. Pendant cette période critique, il semblerait que les voies métaboliques permettant de produire du glucose 6P soient plus activées chez les R par rapport aux S, traduisant une différence de comportement d'ingestion. Il y aurait ainsi un approvisionnement énergétique des glucides différent entre R et S, en faveur des R avec une potentialité de production de glucose 6P accrue, pendant la période critique de gamétogenèse.

Le déficit énergétique mis en évidence durant la phase critique par ces études suggère donc que les huîtres soient physiologiquement affaiblies. Cet affaiblissement peut avoir de nombreuses conséquences, notamment au niveau de ses capacités de défense contre les pathogènes.

### 2.3.2.3 L'immunité

Afin d'étudier la potentielle implication de l'immunité dans l'apparition des mortalités estivales, un suivi des paramètres hématocytaires de l'huître au cours d'un cycle entier a été réalisé, les hémocytes étant considérés comme les principaux effecteurs cellulaires du système de défense (Cheng, 1996). Les résultats montrent un minimum de concentration hémocytaire, de taux de phagocytose, de taux d'adhésion des hémocytes et de capacité de production de radicaux libres oxygénés (RLO) pendant la période critique associée à la période de reproduction. Ces résultats peuvent être rapprochés des travaux de Fisher (1986) qui ont mis en évidence chez *C. virginica* une augmentation de la durée de fixation des hémocytes au cours de la gamétogenèse, paramètre assimilé à la baisse de capacité d'adhésion pendant cette période. Ainsi, il semblerait que l'augmentation de la température de l'eau ainsi que la période de reproduction associée à la période critique des mortalités représentent des facteurs pouvant affecter les capacités immunitaires de l'huître.

Il a également été montré que le niveau nutritionnel et sa qualité pouvaient modifier les paramètres hématocytaires (Delaporte *et al.*, 2006) ainsi que la présence de pathogènes bactériens (Labreuche *et al.*, 2006). Cependant les tendances observées sur le terrain sont très variables et mettent en avant la complexité des interactions environnement - reproduction - système de défense. D'autres expérimentations semblent donc nécessaires pour relier de

manière certaine les modifications des paramètres hématocytaires observés et la sensibilité aux mortalités estivales.

Afin d'aller plus loin dans l'hypothèse selon laquelle la baisse des paramètres hématocytaires associée à la période de reproduction peut constituer un facteur aggravant, les capacités de défense des huîtres R et S ont été comparées, lors de phénomènes de mortalité estivale. Les résultats obtenus montrent que les paramètres hématocytaires des huîtres R ne sont pas systématiquement différents de ceux des huîtres S, mais que le système de défense de ces deux catégories d'huîtres peut répondre différemment à un stress, à une maladie, l'un s'adaptant mieux aux perturbations que l'autre. En effet, sous l'effet d'un stress (hypoxique ou bactérien), les huîtres R semblent capables de maintenir leur capacité de phagocytose, voire de l'augmenter, alors que les huîtres S voient cette activité réduite. De plus, dans certaines expériences, les hémocytes des huîtres S présentent une plus forte production de RLO un mois avant la mortalité (Figure 29), ainsi qu'une plus faible capacité d'adhésion, mettant en évidence des différences au niveau de la gestion des systèmes de défense.

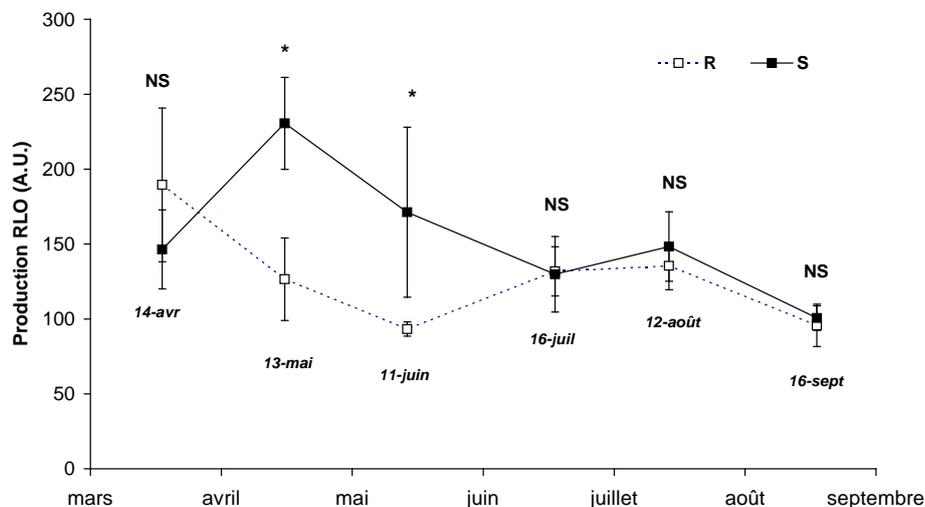


Figure 29 : Capacité moyenne de production de radicaux libres oxygénés (RLO) en unité arbitraire par granulocyte, mesurés sur des huîtres Résistantes et Sensibles de mars à Septembre 2003. NS : pas de différence significative entre R et S; \*: différence significative, ANOVA,  $p < 0,05$ .

D'après Samain & McCombie, 2008.

Les résultats montrent qu'il existe probablement une base génétique aux variations des paramètres hématocytaires des huîtres, principalement marquée par la production différente de RLO entre les huîtres R et S un mois avant la mortalité. Il semble qu'une telle induction

puisse caractériser un effet des conditions environnementales combinées à l'état physiologique des animaux qui répondent à cette pression par la modulation de ces paramètres hématocytaires. L'hypothèse d'une meilleure capacité de réponse au stress des huîtres R modulant les paramètres hématocytaires en cas de forte pression environnementale et pendant la période physiologique critique de la reproduction est donc envisagée. Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par les travaux de Lacoste *et al.* (2002) suggérant l'influence du stress sur les fonctions immunitaires de l'huître.

#### 2.3.2.4 La réponse au stress

L'étude des risques liés à l'environnement présentés dans la partie 2.1 ont mis en évidence les différentes sources de stress pouvant affecter l'huître. Par exemple, les effets liés à l'augmentation de température, à l'hypoxie, les effets liés aux xénobiotiques, aux pesticides ou au relargage de sulfure et d'ammonium contenus dans les sédiments sont autant de facteurs pouvant engendrer des processus de réponse au stress chez l'huître (Torreilles *et al.*, 1996 ; Auffret *et al.*, 2002 ; Abele *et al.*, 2002 ; Hermes-Lima *et al.*, 1998). Ces facteurs peuvent avoir des effets sur la physiologie de l'huître, qui établit des processus de réponse au stress, ayant des conséquences au niveau de son métabolisme général.

L'effort d'adaptation représentatif du stress peut être étudié à partir de mécanismes cellulaires comme la chaîne respiratoire mitochondriale car elle joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de la transformation de l'oxygène en molécules d'eau. L'altération de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie est une première cause d'augmentation du stress oxydant qui est issu de la présence excessive de RLO. Ce stress oxydant peut être lié à la présence de polluants chimiques mais également de facteurs environnementaux (*i.e.* température). Les cellules utilisent alors de nombreuses stratégies de défenses antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau de RLO. Enfin, les effets liés au stress peuvent également être étudiés au niveau sub-cellulaire, en analysant les conséquences bio-énergétiques et métaboliques, mais aussi les effets sur la consommation d'oxygène et des charges énergétiques lorsque l'huître est soumise à des conditions stressantes.

Les mécanismes d'adaptation mis en œuvre par l'huître, en réponse à des situations de stress, tels que des stress hypoxiques engendrant un « stress respiratoire » ou des stress liés à des expositions aux pesticides engendrant un « stress oxydant » ont donc été analysés à l'aide de marqueurs moléculaires et enzymatiques. En effet, ces deux types de stress apparaissent comme les plus représentatifs des conditions environnementales dans lesquelles évoluent les huîtres.

- *Le stress respiratoire*

Une des conséquences commune à l'augmentation de la température de l'eau et à l'apport d'eau douce via la pluviométrie est le phénomène d'hypoxie. Les conséquences d'une diminution de la présence d'oxygène dans le milieu ont donc été étudiées, afin d'observer les modifications physiologiques engendrées.

Les résultats obtenus mettent en évidence que l'adaptation à l'hypoxie se manifeste à plusieurs étapes du métabolisme énergétique. En premier lieu, l'organisme réduit ses besoins en diminuant l'assimilé (baisse de l'ingestion et de l'efficacité d'absorption) et, par conséquent, la consommation d'oxygène. Au plan métabolique, les marqueurs de la glycolyse et de l'activité mitochondriale révèlent que l'organisme entier n'est pas engagé sur une voie d'anaérobie stricte. L'inhibition de l'activité de la Pyruvate Kinase (PK), représentant une réponse à l'hypoxie (Greenway & Storey, 2000), provoque la réduction du flux métabolique de la glycolyse vers le cycle de Krebs. L'inhibition de la PK semble également accompagnée par l'accumulation d'alanine qui, chez les mollusques et les crustacés, est significative de chocs osmotiques et de l'anoxie (Deaton, 2001 ; Fujimori & Abe, 2002). Enfin, la sur-activation du système de transport d'électrons (ETS) est probablement un mode d'adaptation permettant de maintenir la production d'énergie puisque le stock d'ATP représenté par la charge énergétique (CEA) est peu différent entre l'hypoxie et la normoxie : l'organisme tente de compenser la faible disponibilité en oxygène par une sur-activation de la chaîne respiratoire, ce qui permet de maintenir le niveau de la charge énergétique à un niveau non critique (Ivanovici, 1980).

D'autres analyses de ces paramètres (PK, ETS et CEA), réalisées sur des huîtres élevées à 15 ou à 70 cm du sédiment, ont mis en évidence que les effets de la proximité du sédiment s'apparentaient aux effets liés à des conditions hypoxiques observés en conditions expérimentales. En effet, le modèle de réponse pour les huîtres élevées près du sédiment par rapport à celles élevées plus haut se caractérise par 1) une tendance à la diminution de l'activité de la PK 2) une tendance à la stimulation du système ETS conduisant à un déficit énergétique traduit par 3) une charge énergétique significativement plus faible. Les huîtres élevées près du sédiment pourraient donc avoir subi un déficit en oxygène et/ou subi les effets de composés relargués du sédiment dans la colonne d'eau. De plus, il a déjà été montré que les sulfures contenus dans les sédiments ont un impact sur la physiologie respiratoire (Encomio, 1998) et génèrent des mortalités après une exposition prolongée (Laudien et al, 2002) car le soufre se substitue à l'oxygène comme accepteur d'électron au niveau de la chaîne respiratoire.

La réponse au stress hypoxique a également été appréhendée au niveau du transcriptome dans le cadre du programme MOREST, afin d'étudier plus globalement la cascade de processus moléculaires et physiologiques impliqués dans le métabolisme d'adaptation à l'hypoxie (David *et al.*, 2005). Les gènes dont l'expression s'est trouvée potentiellement régulée par ce type de stress environnemental étaient associés à 12 fonctions physiologiques majeures : reproduction, protéines de stress, régulation des protéines, régulation des acides nucléiques, chaîne respiratoire, structure, métabolisme des lipides, métabolisme énergétique, métabolisme des acides aminés, communication cellulaire, détoxification et développement (Figure 30). Parmi ces gènes, une majorité correspondait à des enzymes ou des protéines impliquées dans la communication cellulaire, la régulation des protéines ou dans le métabolisme énergétique, suggérant une réelle influence du stress lié à l'hypoxie sur les paramètres physiologiques de l'huître.

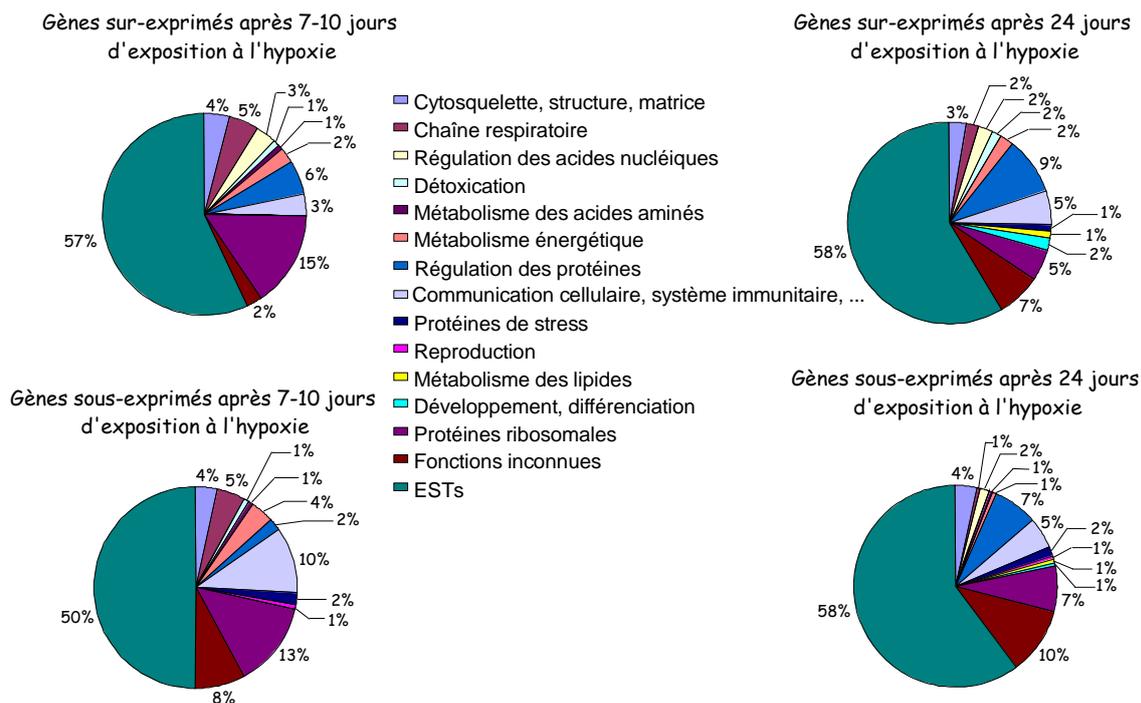


Figure 30 : Identification et classification par catégories fonctionnelles de gènes régulés par l'hypoxie, d'après David *et al.*, 2005. (EST = Expressed Sequences Tags)

Cette approche transcriptomique a ainsi permis d'identifier de nouveaux gènes candidats dont l'expression est influencée par l'hypoxie, tels que la carbonic anhydrase, impliquée dans les échanges de gaz associés à la respiration, la delta-9 desaturase impliquée dans le métabolisme des lipides, la Gluthathione Peroxidase directement impliquée dans le métabolisme oxydatif (Kinnula *et al.*, 1995), ou encore des métallothionéines potentiellement impliquées dans les défenses contre les oxydants (Suzuki & Cherian 2000). Cette étude a donc contribué à l'identification de plusieurs marqueurs génétiques qui pourront être utilisés dans l'exploration des mécanismes de tolérance au stress de l'huître.

- *Le stress oxydant*

Le stress oxydant (ou stress oxydatif) est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux RLO, qui, lorsqu'ils sont produits en trop grande quantité, peuvent induire des phénomènes de peroxydation des lipides, d'oxydation de protéines ou encore de dommages à l'ADN (Manduzio *et al.*, 2005). Il a été montré que ce type de stress pouvait intervenir en réponse à l'exposition à des substances toxiques (De Almeida *et al.*, 2007 ; Ahmad *et al.*, 2006). Ainsi, pour étudier l'influence du stress oxydant sur la physiologie de l'huître, l'analyse de cinq biomarqueurs représentatifs de ce stress a été réalisée sur des huîtres

exposées à des substances toxiques (Lau & Wong, 2003) : la catalase, les metallothionéines (MT), la glutamine synthétase (GS), la glutathion-s-transférase (GST), et les protéines de choc thermique (HSP).

La catalase est la principale enzyme capable de détruire le peroxyde d'hydrogène, substance prooxydante produite dans le cas d'un stress (Jo *et al.*, 2008). La GST est une enzyme caractéristique de la détoxification des mollusques bivalves (Willet *et al.*, 2000). Les MT sont impliquées dans la détoxification des métaux lourds et jouent un rôle antioxydant important chez l'huître (Anderson *et al.*, 1999). La GS est impliquée dans le métabolisme de l'azote (Saha *et al.*, 2002) et peut servir d'indicateur de stress oxydant dans l'apparition de pathologie (Cui *et al.*, 2004). Les HSP, telles que les HSP 70, jouent un rôle essentiel dans le processus de translocation, de stabilisation et d'assemblage des protéines (Boutet *et al.*, 2003). Elles interviennent également dans la réparation des dommages oxydatifs induits sur les protéines et ont un rôle fondamental dans le développement de cellules germinales ainsi que dans la régulation du développement des ovocytes chez l'humain (Neuer *et al.*, 1999). Ces protéines permettent aux cellules de résister à un stress en prolongeant leur viabilité jusqu'à disparition du stress. L'implication des HSP 70 dans la réponse d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycyclique a été décrite chez *C. gigas* (Boutet *et al.*, 2004).

Les études du stress oxydant via les mesures enzymatiques de ces biomarqueurs sur des huîtres élevées à 70 ou à 15 cm du sédiment ont mis en évidence des différences de sensibilité et de cinétique de réponse de ces biomarqueurs. Les résultats illustrent en effet un stress oxydant plus important à proximité du sédiment, confirmant ainsi un effort métabolique d'adaptation plus élevé à son voisinage, et ce durant les trois semaines précédant l'apparition des mortalités.

Suite à ces résultats, des études ont été réalisées afin d'évaluer l'activation du métabolisme antioxydant des huîtres R et S en situation de stress. Pour cela, les activités des enzymes anti-oxydantes présentées précédemment (catalase, GS, GST, MT et HSP70) ont été mesurées sur des huîtres R et S placées dans des conditions stressantes provoquées par des expositions à l'hypoxie ou au pesticide. Les résultats obtenus dans ces conditions montrent que les protéines de choc thermique (HSP70) apparaissent très supérieures chez les huîtres S par rapport aux huîtres R. Cette activation plus élevée des HSP70 d'huîtres S semble donc indiquer une capacité à mobiliser plus activement des protéines constitutives, en conditions stressantes.

*A contrario*, les huîtres R montrent une tendance à augmenter les activités enzymatiques GS et catalase par rapport aux S, en condition d'hypoxie comme en condition d'exposition aux pesticides. Les activités enzymatiques de ces enzymes, impliquées dans des mécanismes de défense antioxydant, pourraient illustrer la voie d'activation métabolique privilégiée par les huîtres R. Cette différence de capacité de régulation métabolique entre les huîtres R et S se traduit également par une plus grande expression des MT chez les huîtres S. Les MT sont directement impliquées dans la régulation de l'homéostasie et des métaux intracellulaires (Tanguy *et al.*, 2001) et sont également impliquées dans le cycle de reproduction chez les bivalves (Gagné & Blaise, 2003). Ainsi, le lien potentiel des MT avec la gamétogenèse pourrait expliquer une modulation plus active chez les huîtres S privilégiant un effort de reproduction, au détriment des défenses anti-oxydantes.

Les résultats mettent en évidence que les huîtres R et S, soumises à des situations de stress, montrent des capacités de régulation privilégiant l'activation de mécanismes enzymatiques et protéiques différents, pouvant entraîner des différences dans l'utilisation des ressources métaboliques. De plus, il semblerait que ces différences d'activation métabolique puissent résulter de stratégies de reproduction différentes, influençant l'activation plus ou moins tardive du système antioxydant, en fonction de l'investissement alloué à la reproduction.

En conclusion de toutes ces analyses, chaque paramètre étudié et considéré individuellement lors de ces travaux est à prendre en compte en terme de paramètre intervenant dans un schéma d'interactions à l'origine des mortalités estivales. Malgré les nombreuses hypothèses apportées par les études du programme MOREST, les mécanismes fins de la résistance à la mortalité estivale restent à étudier afin de d'identifier les causes et les conséquences physiologiques de ce phénomène.

## **3. Problématique, objectifs et moyens**

### **3.1 La problématique**

Les résultats du défi MOREST ont démontré l'existence d'une interaction complexe entre l'environnement, les pathogènes opportunistes et l'huître. Plus particulièrement au niveau de l'huître, il semblerait que de nombreux processus soient impliqués, comprenant la reproduction, la réponse au stress, et la défense immunitaire. De plus, les premiers travaux de caractérisation phénotypique réalisés entre les souches d'huîtres Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale ont déjà mis en évidence, dans certains cas, des différences au niveau de la stratégie de reproduction, des flux énergétiques glucidiques, des voies de régulation du système anti-oxydant et enfin, au niveau de certains paramètres hématocytaires.

Les différentes observations du paragraphe précédent font donc état de la complexité de ces mortalités multifactorielles. Bien que de nombreux facteurs soient élucidés et qu'un modèle d'interaction ait été construit grâce aux données du programme MOREST, il reste toujours une interrogation forte sur les mécanismes physiologiques mis en jeu par l'huître pour survivre durant la période estivale, qui peut être formulée ainsi : quels sont les caractères intrinsèques à l'animal sélectionnés permettant de produire des souches d'huîtres résistantes et sensibles à la mortalité estivale ?

### **3.2 Les objectifs**

Les objectifs généraux de cette thèse sont d'identifier des déterminants moléculaires de la survie estivale, et ainsi d'identifier des marqueurs du/des mécanisme(s) physiologique(s) impliqué(s) dans cette survie. Plus précisément, le but est d'identifier et de caractériser les différences du transcriptome des souches Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale, afin d'identifier les processus potentiellement affectés lors des épisodes de mortalité.

### 3.3 Les moyens

Afin d'identifier des déterminants moléculaires de la survie estivale, une large comparaison transcriptomique des souches Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale, via les puces à ADN, a été réalisée. Les résultats issus de ces travaux seront présentés selon 4 chapitres :

➤ Un **premier chapitre** faisant état de la production de séquences d'huîtres *Crassostrea gigas*, générées dans le cadre de divers programmes (Réseau d'excellence « Marine Genomic Europe », le programme européen « Aquafirst », et le programme de séquençage « Genoscope »), toutes rassemblées dans une base de données unique, accessible via la Web. Cette production de séquences, ou plus précisément « d'étiquettes de gène » nommées Expressed Sequences Tags (ESTs), constitue la base d'étude du transcriptome de *C. gigas*, le but étant d'étudier les variations d'un maximum de gènes possible dans une ou plusieurs conditions. La plupart de ces séquences seront utilisées pour la comparaison du transcriptome des huîtres Résistantes et Sensibles.

➤ Un **second chapitre** détaillant la comparaison transcriptomique d'huîtres R et S prélevées *in situ* au cours d'un évènement ayant conduit à la mortalité estivale. Cette étude permettra, via l'analyse des puces à ADN, de déterminer les gènes dont l'expression diffère selon le caractère « R » ou « S ». Plus particulièrement, cette analyse permettra de sélectionner certains candidats, qui, en fonction de leur annotation ou de leur différentiel d'expression, représentent un grand intérêt dans l'étude du phénomène de survie estivale. L'identification des fonctions associées à ces candidats permettra ainsi de bâtir des hypothèses sur les fonctions physiologiques affectées pouvant conduire au phénomène de mortalité.

➤ Un **troisième chapitre** illustrant l'analyse physiologique approfondie d'un candidat sélectionné pour son annotation et son différentiel d'expression entre les souches R et S : le gène *oyster-gonadal-transforming-growth-factor- $\beta$* . Des analyses d'expression spatio-temporelles ont été réalisées sur ce candidat, dans le but d'avancer

dans la compréhension de sa fonction au sein de l'huître, pour, à terme, comprendre sa potentielle implication dans les processus affectés lors des mortalités estivales.

➤ Enfin, un **quatrième chapitre** discutant de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse pour en dégager des perspectives de recherche concernant l'identification des processus physiologiques associés aux mortalités estivales. Cela passera par la recherche, via la cartographie des candidats précédemment mis en évidence, des Quantitative Trait Loci (QTLs) de la survie estivale (*i.e.* marqueurs liés à des gènes impliqués dans la variation du caractère) dans des familles ségrégeantes pour le critère survie estivale. Cela passera également par la mise en place d'analyses fonctionnelles développées sur les gènes candidats, afin de valider leur fonction au sein de l'huître et d'étudier leur implication au niveau des mortalités estivales.



---

**Premier chapitre :**  
**Génération et analyse d'un**  
**grand nombre d'ESTs chez**  
***Crassostrea gigas***

---



# 1. Présentation générale et résumé de l'article

La génomique est une discipline de la biologie moderne qui a pour objet l'étude du fonctionnement d'un organisme à l'échelle de son génome, et non plus limité à quelques gènes. Cette discipline a connu un essor avec notamment le développement des techniques de séquençage des génomes et la médiatisation, à la fin du XX<sup>e</sup> siècle, de la première carte du génome humain. Depuis lors, les génomes complets de nombreuses espèces vivantes ont été séquencés ce qui a permis le développement de cette discipline dite de « génomique ». Cette discipline permet d'étudier le génome d'un organisme via, par exemple, le nombre de gènes qui le compose, la fonction de certains gènes particuliers, les cascades de régulation de gènes associés à des processus physiologiques, ou encore la phylogénie.

Les études de génomique se sont par exemple largement développées sur des espèces d'intérêt agronomique telles que la truite arc-en-ciel. Récemment, les chercheurs de l'INRA ont obtenu près de 100000 séquences de gènes exprimés dans différents organes ou dans différentes situations physiologiques de la truite arc-en-ciel (Govoroun *et al.*, 2006). Les études de génomique associées ont ainsi permis d'enrichir les connaissances sur la régulation de la reproduction de cette espèce (*i.e.* Bobe *et al.*, 2006), et tendent aujourd'hui à une connaissance globale des réseaux d'activation des gènes, de leurs régulations et de leurs interactions.

En ce qui concerne l'huître *Crassostrea gigas*, de nombreux projets se sont développés afin d'augmenter le nombre de séquences spécifiques à cette espèce, et ainsi permettre le développement d'outils de génomique. Pour cela, le séquençage de plus de 56000 Expressed Sequences Tags (ESTs) a été réalisé. Ces ESTs représentent des « étiquettes » des séquences d'ADNc, permettant d'obtenir des informations sur la part du génome exprimé et d'attribuer une identité à chaque clone.

Afin de produire ces ESTs, deux types d'approche ont été privilégiés : la création de banques normalisées spécifiques de différents tissus, afin d'obtenir des séquences d'intérêt propres à l'étude de processus physiologiques (*i.e.* banques d'hémocytes pour étudier l'immunité ou banques de gonade pour étudier la reproduction), et la réalisation de banques soustractives entre des huîtres Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale afin d'augmenter le nombre d'ESTs candidates pour l'étude du différentiel de ces deux souches. Les différents programmes et les méthodes mis en place pour obtenir ces séquences sont détaillées ci-après.

Le programme européen « Aquafirst », mis en place afin d'identifier des marqueurs de résistance au stress et aux maladies chez l'huître, a permis de réaliser des banques soustractives sur six tissus différents (gonade, manteau, glande digestive, muscle, hémocytes, branchies) entre les deux lignées d'huîtres Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale (soustraites dans les deux sens « R – S » et « S – R »). L'hybridation soustractive a permis d'obtenir des librairies contenant les ESTs différentiellement présentes entre les souches R et S, et dans lesquelles le nombre de copies de tous les ADNc est égalisé. Pour ces analyses, deux prélèvements *in situ* (Bretagne Sud, France) ont été effectués selon deux dates précédant l'apparition de la mortalité, et des pools de vingt-quatre huîtres ont été réalisés pour chaque tissu (soit douze huîtres prélevées pour chaque date et pour chaque lignée). Ces travaux ont permis d'obtenir 8064 ESTs issues de ces six banques soustractives.

Ces séquences se sont ajoutées à celles préalablement obtenues dans le cadre du réseau d'excellence « Marine Genomic Europe » (<http://www.marine-genomics-europe.org/>) qui a généré 5860 séquences à partir de quatre librairies d'ADNc normalisées issues de trois tissus différents (Tanguy *et al.*, 2008). La première librairie a été construite à partir du tissu branchial prélevé sur des huîtres issues de quatre conditions différentes : 1) des huîtres non infectées, 2) des huîtres infectées par injection d'un mix bactérien préalablement tué par chauffage, 3) des huîtres infectées par injection de ce mix bactérien vivant, et 4) des huîtres infectées par balnéation de ce même mix. Les deux autres librairies ont été réalisées sur le même tissu « glande digestive », prélevé sur des huîtres en condition standard ou sur des huîtres stressées par des hydrocarbures, des pesticides et des conditions hypoxiques. Enfin, la quatrième librairie correspond au tissu gonadique prélevé sur des huîtres mâles et femelles à 4 stades reproducteurs différents (stade 0 : prolifération des cellules souches, stade 1 : mitoses goniales, stade 2 : maturation des cellules germinales par méiose, stade 3 pleine maturité). Récemment, un séquençage complémentaire de cette librairie de gonade a permis de générer 12162 séquences supplémentaires.

Enfin, dans le cadre d'un projet plus récent associé au « Génoscope » (CEA, Evry), 14472 séquences ont été produites à partir d'une librairie normalisée « hémocytes » contenant des hémocytes prélevés sur des huîtres issues de 4 conditions d'infection différentes : 1) avec des bactéries non virulentes vivantes, 2) avec des bactéries virulentes vivantes, 3) avec des bactéries virulentes tuées, et 4) sans infection. Dans ce même projet, une autre librairie normalisée réalisée à partir des stades de développement larvaire et embryonnaire (ovocytes,

embryons 4 et 8 cellules, morulas, blastulas, gastrulas, larves trochopores, larves D, larves piédivéligères, et des larves post-fixation), et complétée par des ganglions viscéraux de l'huître, a permis de générer 13191 séquences.

Les séquences issues de l'ensemble de ces programmes ont toutes été rassemblées dans une unique base de données, nommée « GigasDatabase », en y associant également toutes les séquences « publiques » (*i.e.* déjà disponibles dans les banques de données) disponibles chez *C. gigas*. Cette base de données, réalisée par l'équipe SIGENAE de Toulouse, est accessible via Internet à l'adresse :

[http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/).

Pour la première fois, toutes les séquences transcrites associées à *C. gigas* y ont été « contiguées », c'est-à-dire que les séquences provenant d'un même gène ont été regroupées. Cette étape a permis de réduire les redondances et d'allonger la taille des séquences obtenues. Ainsi, la banque contient :

- 7940 contigs
- 21805 singulets

ce qui représente un total de 29745 séquences uniques, dont la taille moyenne est de 798 paires de bases. La création de cette base de données représente un formidable atout dans le développement des analyses de génomique de *C. gigas*, et facilite l'exploitation des séquences via les nombreuses fonctionnalités disponibles, permettant d'accéder à l'ensemble des informations relatives à ces séquences. Certaines de ces fonctionnalités sont exposées ci-dessous.

Pour chaque contig contenu dans la base, il est possible d'identifier les séquences appartenant à ce contig. Il est ainsi possible de distinguer visuellement les zones de recouvrement des séquences, des liens permettant d'accéder directement aux informations relatives à chaque séquence concernée (Figure 31).

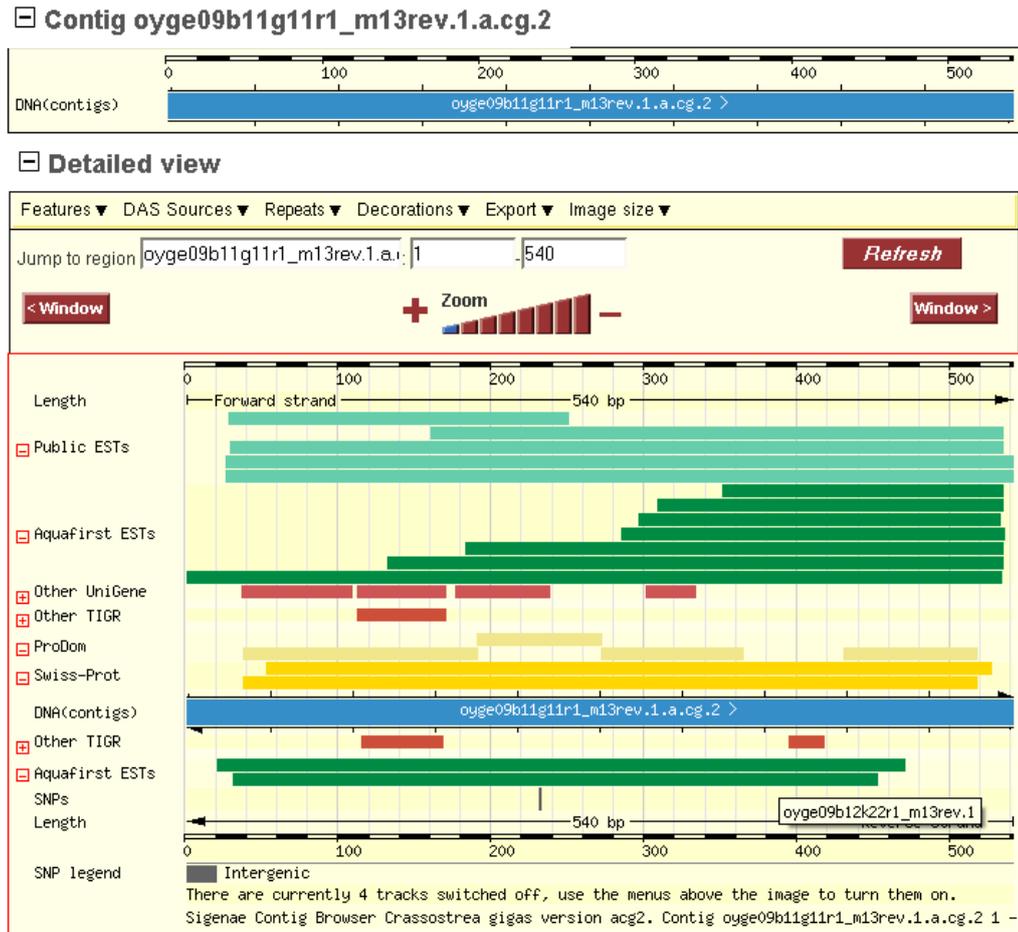


Figure 31 : Détail des séquences formant un contig dans la base GigasDatabase.

Pour chaque séquence, différents types d'informations sont accessibles tels que le chromatogramme correspondant, la provenance de la séquence (*i.e.* librairie associée), sa qualité, sa taille, la localisation du vecteur et de l'insert, le type de plasmide utilisé ... etc. (Figure 32)



Figure 32 : Informations disponibles pour une séquence contenue dans la base GigasDatabase.

Enfin, une des autres fonctionnalités de la base est la possibilité d'effectuer plusieurs types de requêtes permettant d'accéder aux séquences recherchées (Figure 33). En effet, l'outil « Data Mining Biomart » permet d'effectuer des recherches de séquences selon les noms de clones, les noms de contig, la taille de séquence, par mots clefs, par tissus d'expression, par gene ontology (...) ou par Blast : cet outil permet entre autre de rechercher la présence de séquences similaires à des séquences connues chez d'autres espèces (en « blastant » alors la séquence connue d'une autre espèce dans la base).

◀ back
next ▶

**DATASET 1**

**SIGENAE CONTIG:**

Name  
equal ▾

Length  
length >  
length <

Depth  
depth >  
depth <

Best SP Hit Accession

Best SP Hit Description

Parcourir...

**EST and mRNA:**

Class Name  
EST Name(s) ▾

oypg10b08g18r1\_m13rev.1

Library

Parcourir...

**CLONES:**

Name  
equal ▾

Parcourir...

**PROTEIC HITS:**

Database  
SwissProt ▾

Accession

Description

is the best HSP  
 Only  
 Excluded

**NUCLEIC HITS:**

Database  
Other TIGR ▾

Organism  
Fugu ▾

Accession

Description

is the best HSP  
 Only  
 Excluded

**GENOMIC HITS:**

Organism  
Fugu Ensembl Transcripts ▾

Chromosome

Start

Stop

is the best HSP  
 Only  
 Excluded

**EXPRESSION:**

Tissues

Development Stages

**KEYWORDS:**

Keyword

**GENE ONTOLOGY:**

Ontology  
Biological process ▾

Evidence  
IC ▾

GO Code  
GO:0008150

is a Terminal Node  
 Only  
 Excluded

**REPEATS:**

Name

Class

Type  
Dust ▾

**SNP:**

Source  
putativeSNP ▾

**count**

**Summary**

▶ start

- Dataset: Sigenae Oyster Contigs

① 26724 Entries Total

▶ filter

- EST Name(s): Uploaded

① 1 Entries pass Filters

▶ output

- ATTRIBUTES

① 1 Results in Output

Figure 33 : Les différents modes de requête disponibles dans la base GigasDatabase.

Une fois les requêtes effectuées, les séquences correspondant à la recherche peuvent être exportées. Là encore, plusieurs informations peuvent être recueillies, telles que les noms des contigs, la taille des séquences, les meilleurs hits obtenus par Blast, les mots clefs, les « Gene Ontology » associés aux séquences, ou encore les séquences au format FASTA (Figure 34).

The screenshot displays the 'Siganae Contig Extraction' interface. At the top, there are 'back' and 'export' buttons. The main area is divided into several sections, each with a list of fields and checkboxes for selection:

- Contig:** Name, Depth, Best SP hit description, Best SP hit query stop, Best SP hit subject stop, Best SP hit score, Length, Best SP hit accession, Best SP hit query start, Best SP hit subject start, Best SP hit evaluate, Best SP hit % identity.
- EST and mRNA:** EST Name, Type, Plate, Plate column, Genbank accession, Library, Plate row.
- Clone:** Clone Name.
- Proteic Hits:** Database, Description, Query stop, Subject stop, Score, Accession, Query start, Subject start, Evaluate, % identity.
- Nucleic Hits:** Database, Description, Query stop, Subject stop, Score, Accession, Query start, Subject start, Evaluate, % identity.
- Genomic Hits:** Species, Query start, Subject start, Chromosome, Query stop, Subject stop.
- Expression:** Tissue, Development stage.
- Keywords:** Keyword.
- Gene Ontology:** Ontology, Code.
- Repeats:** Repeat Name, Type, Repeat stop, Class, Repeat start, Repeat strand.
- SNP:** Name, Type, Upstream seq, Source, Allele, Downstream seq.
- Fasta File:** Sequences.

Below these sections are two more configuration areas:

- Select the output format:** HTML (selected), Text, comma separated, MS Excel, Text, fixed width, Text, tab separated.
- File compression:** None (selected), gzip (.gz).

On the right side, a 'Summary' panel shows:
 

- count**
- start**
- Dataset: Siganae Oyster Contigs
- 26724 Entries Total
- filter**
- EST Name(s): Uploaded
- 1 Entries pass Filters
- output**
- ATTRIBUTES
- 1 Results in Output

Figure 34 : Les différentes possibilités d'exportation des résultats suite à une requête effectuée dans la base GigasDatabase.

Le regroupement de ces séquences a permis de réaliser plusieurs analyses, telles que la recherche de Microsatellite *in silico* (Msat), ou encore de putatifs Single Nucleotide Polymorphism (SNPs), liés aux études du polymorphisme de *C. gigas*. Ainsi, il a été identifié 208 Msat pour l'ensemble de ces séquences. Parmi ceux-ci, 18 marqueurs associés ont déjà été développés, et sont actuellement utilisés pour la cartographie génétique ou encore la recherche de Quantitative Trait Loci (QTLs) (Sauvage, 2008). Parallèlement à cela, un total de 7530 putatifs SNPs a été identifié, représentant un taux de 1 SNP pour 75 bp, et confirmant ainsi le fait que l'huître creuse est une espèce très polymorphe. L'identification de ces SNPs servira, entre autre, à l'étude génétique des populations d'huîtres creuses afin de détecter des effets potentiels de sélection dans la région codante des gènes régulés par des facteurs environnementaux.

Des études d'annotation fonctionnelle ont également été réalisées sur l'ensemble des séquences de la base. Les résultats indiquent qu'environ 43% des séquences sont annotées, selon un seuil de significativité (c'est-à-dire de E-value) inférieur à  $10^{-6}$ . Des regroupements fonctionnels ont ensuite permis de mettre en évidence les différentes catégories représentées parmi l'ensemble de ces gènes (Figure 35). Ainsi, 42% des séquences annotées sont reliées au « Métabolisme » (métabolisme énergétique, glucidique, lipidique ...), 12% au « Procédés génétiques » (transcription, réplication ...), 14% au « Procédés liés à la transmission d'information » (transport membranaire, transduction de signal ...) et enfin 32% sont impliquées dans les « Processus cellulaires » (système endocrine, mobilité cellulaire, développement ...).

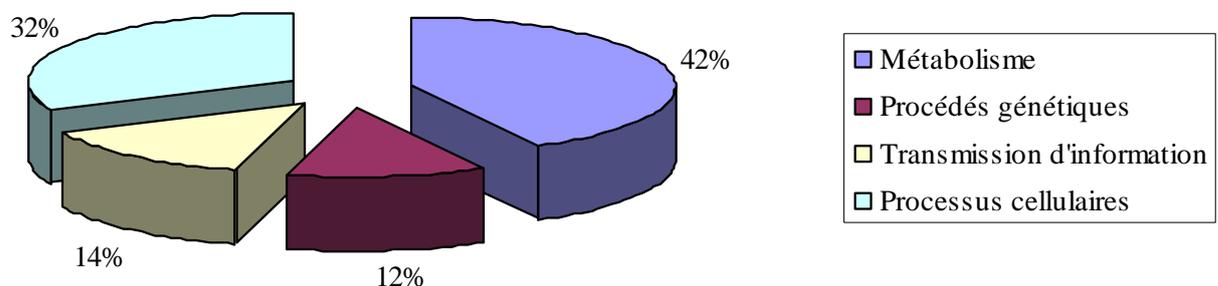


Figure 35 : Fonctions associées à l'ensemble des séquences disponibles dans la base de données de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : la GigasDatabase

Le travail d'annotation de ces séquences a permis de rechercher des candidats ciblés, en lien avec les différentes thématiques abordées par les équipes impliquées. Ainsi, plusieurs candidats d'intérêt ont été relevés, en lien avec les contrôles endocrines et paracrines, avec le métabolisme énergétique et la reproduction ou encore avec l'immunité (Tableau 2).

	<b>Numéro d'accension</b>	<i>Meilleur « hit »</i>
<b>Contrôles Endo-paracrine</b>	CU997995	activin/myostatin like
	CU984230	inhibin bA like
	CU998397, CU990571	smad
	CU994284, CU991852, CU987529, CU984099, CU991056	follicle-stimulating hormone receptor 1
	CU998185, CU991852, CU983909, CU993729, CU987283, CU993729, CU988008	thrombospondin
	FP011148	cysteine rich bmp regulator 2
	CU997999	tolloid-like protein
<b>Métabolisme énergétique/reproduction</b>	FP001644, FP008029, FP008849, FP002487, CU984370, CU989738, CU997056	c1q-like adipose specific protein
	FP000698	leptin receptor overlapping transcript-like 1
	FP010154, FP001573, CU993420, CU991531	ovary-specific c1q-like factor
	FP008650	phosphatidylinositol 3-kinase p110 beta
	CU994294, CU990696	acetyl-coenzyme a carboxylase alpha
	CU994253	adiponectin receptor 1
	CU993735	camp-dependent protein kinase
	CU993270	carnitine o-acyltransferase
	CU983945, FP005412, CU994912	neuropeptide y
CU991233, CU682842	sterol regulatory element binding factor 1	
<b>Immunité</b>	FP006535, FP010171, CU984422, FP005108, CU998652	caspase
	CU683654	cactus
	CU999108, CU988309, CU993827	myeloid differentiation primary response gene
	FP004666, FP011576, FP002604, CU995719	toll
	CU989449, FP009504, CU998458, CU988135	kappa-b
	CU684230	big defensin
	FP010905	gigasins 2 protein
	FP000856, FP003629, FP006010, FP006279, CU994639	lbp bpi
	FP005503, CU999465, FP006037, FP011761	lipopolysaccharide binding protein
CU983947, CU996720, FP002226	lps-induced tn factor	

Tableau 2 : Sélection de quelques candidats d'intérêts issus de la base de données GigasDatabase, similaires à des gènes potentiellement impliqués dans les réseaux de régulation physiologique.

Les analyses montrent par exemple que de nouveaux transcrits de gènes impliqués dans les diverses voies de la superfamille des TGF- $\beta$  et de leur régulation ont pu être identifiés, notamment deux ligands orthologues des Activines, impliqués chez les deutérostomiens dans la régulation de la reproduction. Des candidats impliqués dans les voies de régulation associées à l'énergie et à la reproduction ont également pu être identifiés (NPY, leptine, adiponectine like, PI3 kinase, AMP kinase).

Enfin, les efforts de séquençage réalisés à travers ces différents programmes permettront, à terme, de faciliter les étapes d'annotation du génome complet de l'huître creuse. En effet, le séquençage entier du génome de l'huître *C. gigas* est actuellement en cours de développement en Chine (P. Boudry, com. pers.) et un consortium nommé « Oyster Genome Consortium » a pour perspective de participer à l'annotation de ce génome. Actuellement, les dernières analyses estiment la taille du génome à 0.91 pg, soit une taille de 824 millions de paires de bases (Mb) (Hedgecock *et al.*, 2005). Ainsi, il apparaît que le génome de l'huître *C. gigas* soit d'une taille relativement faible par rapport à d'autres mollusques, pour lesquels les tailles de génome s'échelonnent aujourd'hui de 0.43 pg pour le gastéropode *Lottia gigantea*, à 7.85 pg pour l'escargot *Diplommatina kiiensis kiiensis* (Gregory, 2008). Plus précisément pour les bivalves, l'estimation de la taille du génome de *C. gigas* se situe parmi les valeurs les plus faibles (Figure 36).

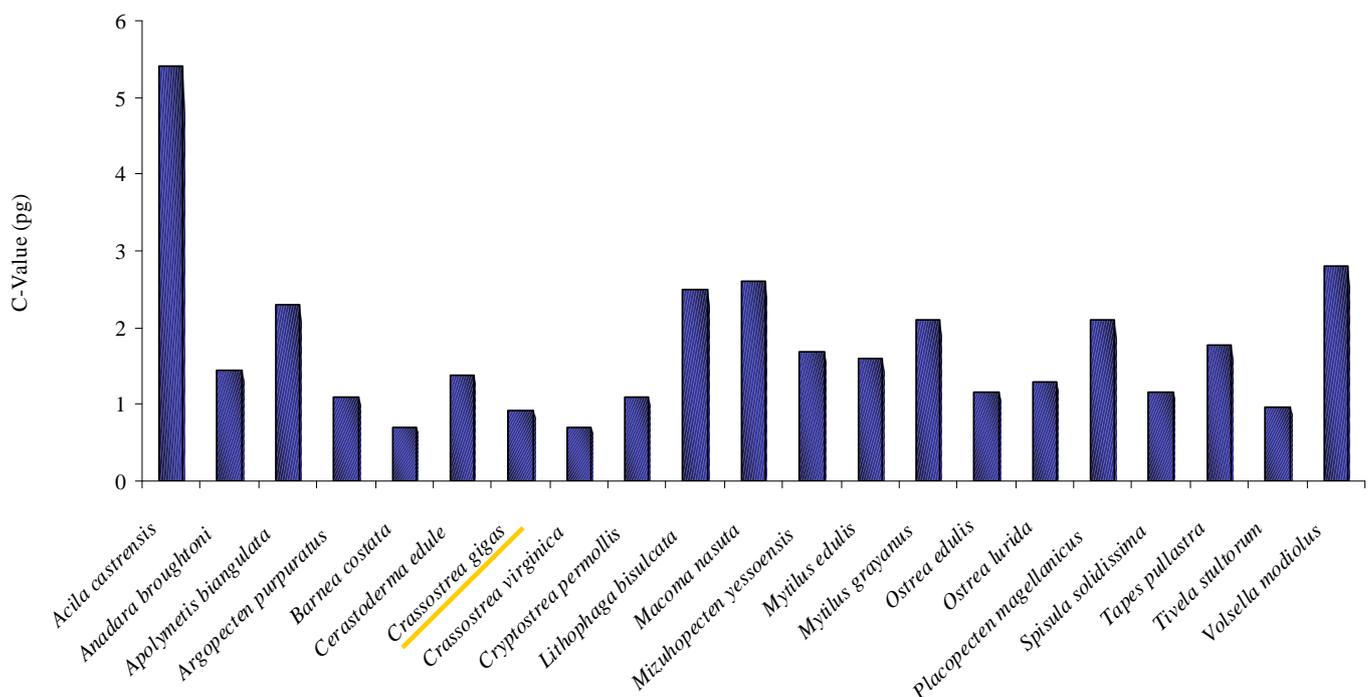


Figure 36 : Estimation de la taille des génomes de quelques bivalves (pg) (Grégory, 2008)

Pour résumer, la collection de données générées par ces différents programmes de séquençage, et leur regroupement dans une base de données unique constitue une ressource très riche pour :

- caractériser de manière plus directe des gènes d'intérêt pour l'étude des principales fonctions physiologiques (croissance, reproduction, métabolisme énergétique, immunité) et générer des marqueurs moléculaires fonctionnels,
- réaliser des analyses phylogénétiques en comparant les séquences générées avec celles de gènes orthologues d'autres mollusques, d'autres Lophotrocozoaires ou d'autres animaux bilatériens,
- identifier des microsatellites et des SNPs dans le cadre d'études génétiques de populations expérimentales ou sauvages,
- développer une cartographie génétique et physique permettant de détecter des relations entre génotype et phénotype par une approche QTL (Quantitative Trait Locus),
- soutenir le projet de séquençage complet du génome,
- identifier les étiquettes transcrites générées par des techniques d'analyse transcriptomique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression),
- réaliser une puce à ADN la plus représentative possible du transcriptome, visant à analyser les variations globales d'expression transcriptionnelle, permettre l'identification de candidats et éventuellement de processus physiologiques régulés sous certaines conditions.

Les travaux et les résultats de production de ces séquences, d'assemblage dans une base de données et les traitements bio-informatiques et statistiques associés sont présentés dans le manuscrit ci-après, soumis au journal BMC Genomics.

## 2. Article n°1

### **Generation and analysis of a large scale repertoire of ESTs from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* assembled in a unique clearing-house**

Authors' names:

Fleury Elodie a, Huvet Arnaud a, Lelong Christophe a, de Lorgeril Julien b, Boulo Viviane b, Gueguen Yannick b, Bachère Evelyne b, Tanguy Arnaud c, Moraga Dario d, Fabioux Caroline d, Lindeque Penelope e, Shaw Jenny e, Reinhardt Richard f, Prunet Patrick g, Davey Grace h, Lapègue Sylvie i, Sauvage Christopher i, Corporeau Charlotte a, Moal Jeanne a, Gavory Frederick j, Wincker Patrick j, Moreews François k, Klopp Christophe k, Mathieu Michel a, Boudry Pierre a, Favrel Pascal a

Addresses:

a UMR M100 Ifremer - Université de Caen Basse-Normandie « Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins », Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané /IBFA, IFR ICORE 146, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France.

b IFREMER CNRS Université de Montpellier 2, UMR 5119 ECOLAG CC 80, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France.

c CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France.

d Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR-CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Nicolas Copernic, 29280, Plouzané, France.

e Plymouth Marine Laboratory, Prospect Place, West Hoe, Plymouth, Devon PL1 3DH, United Kingdom.

f MPI Molecular Genetics, Ihnestrasse 63-73, D-14195 Berlin-Dahlem, Germany.

g Institut National de la Recherche Agronomique, INRA-SCRIBE, IFR 140, Campus de Beaulieu, 35000 Rennes, France.

h National Diagnostics Centre, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland

i Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer La Tremblade, 17390 La Tremblade, France.

j CEA, DSV, Genoscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux CP5706 91057 Evry cedex, France.

k SIGENAE INRA Toulouse 31326 Castanet-Tolosan, France

\* Corresponding author:

Prof. Pascal Favrel, Université de Caen Basse-Normandie, IBFA, IFR ICORE 146, UMR Ifremer 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN Cedex. France.

Tel.: +33 231565361, fax: +33 231565346, Email: [pascal.favrel@unicaen.fr](mailto:pascal.favrel@unicaen.fr)

## **ABSTRACT**

### **Background:**

Three large-scale cDNA sequencing projects for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* were initiated to provide a large number of expressed sequence tags, which were subsequently grouped in a unique clearing-house. Such a database allowed the identification of a large number of transcripts and provides valuable information to further investigate tissue specific and stimulus-dependant gene expression patterns. This data is crucial for constructing representative microarray chips, identifying single nucleotide polymorphic sites in coding regions and microsatellites, and for identification of genes when the whole genome sequence will be available.

### **Results:**

Within the European program Aquafirst, devoted to genetic and functional genomic approaches for stress and resistance marker selection in fish and shellfish, 8,064 expressed sequence tags have been produced by subtraction between two selected oyster lines for six different tissues. These sequences have been added to the previously characterized ESTs from the large scale DNA sequencing project “Marine Genomics Europe”. A more recent sequencing program with Genoscope has allowed the production of an additional 27,663 EST sequences from two different normalized cDNA libraries (“All Developmental stages and central Nervous system” and “Hemocytes” cDNA libraries). All these sequences together with public sequences have been included on a publicly available Website ([http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/)) and clustered into 29,745 unique sequences, consisting of 7,940 contigs and 21,805 singletons. About 43 % of the unique ESTs had significant matches and 27% were annotated using Gene Ontology terms. A total of 208 in silico microsatellites were identified from the ESTs, with 173 having sufficient flanking regions for primer design. A total of 7,530 putative in silico single nucleotide polymorphic sites were also identified using all the existing and the newly generated EST resources of the Pacific oyster.

### **Conclusion:**

In the present work, we describe a publicly available database containing 29,745 unique sequences for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. This database constitutes one of the most developed genomic resources accessible among Lophotrochozoans, an orphan clade of bilaterian animals. This data will certainly boost the development of both the genomics and genetics of a commercially important species which represents the highest annual production of any aquatic organism.

## BACKGROUND

Genome research for a species of interest, such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, is facilitated by the recent development of species-specific tools such as linkage maps [1,2], large-insert libraries [3], public bio-informatics databases [4], and gene expression profiling [5, 6, 7]. Development of genomic resources for *C. gigas* is strongly motivated at several levels: (I) showing the highest annual production of any aquatic organism, *C. gigas* has led to a great deal of research towards the elucidation of molecular mechanisms underlying physiology and genetics of aquaculture relevant traits, (II) its phylogenetic position in the Lophotrochozoa, an understudied clade of bilaterian animals, renders molecular data highly relevant to shed new light on mechanisms of genome evolution, (III) oysters play an important sentinel role in estuarine and coastal marine habitats, where increasing human activities interfere with exploited populations that may suffer from diseases and stress mortality, (IV) *C. gigas* can turn into an invasive species in new habitats where it has been recently introduced [8]. As a result, the Pacific oyster has become an attractive model species for genome-related research activities focusing on comparative immunology [e.g. 9, 10, 11], disease ecology [e.g. 12, 13, 14, 15], stress response to pollutants and parasites [e.g. 16, 17], developmental and reproductive physiology [e.g. 18, 19] and evolutionary genetics [e.g. 20, 21, 22].

Two genomic strategies currently employed in the Pacific oyster for the identification of novel and previously characterized genes affecting phenotypes of interest include the identification of quantitative trait loci (QTL), and high-throughput studies of gene expression. The identification of QTLs in families known to segregate genetic variation affecting a phenotype of interest such as resistance to summer mortality [23] or hybrid vigor [6] requires a large number of mapped molecular markers and correlation of these genotypes with phenotypic information. Results of this whole genome scan reveal chromosomal regions harbouring genes directly affecting a trait. Thanks to the recently developed BAC libraries and their fingerprinting [3] (P. Gaffney, Pers. Com.), fine mapping such regions will ultimately pinpoint the exact DNA sequence variation responsible, allowing gene assisted selection. Functional genomic approaches are utilized for gene expression profiling through experiments involving macroarray [19], microarray [7], SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) [6] or other technologies addressing single genes. Such analyses have potential application for ecological monitoring [24], evaluation of oyster livestock for selective breeding programs, understanding of gene

regulation involved, for example, in the molecular pathways associated with different responses to stress or to specific pathogen infection.

In the present paper, we report the generation and the analysis of 47,889 ESTs through the sequencing of 12,162 clones from the Network of Excellence “Marine Genomics Europe” (MGE) normalized gonad cDNA library (library partly already published in [25]), and through two other projects: I) the Genoscope project (CEA Evry, France) and II) the European project Aquafirst. The Genoscope project (“EST sequencing from *Crassostrea gigas*”) aims to considerably increase genomic information in oysters by producing 14,472 ESTs from a normalized “hemocyte” cDNA library constructed with mRNA from bacteria-challenged and unchallenged hemocytes, and 13,191 ESTs from “all developmental stages and central nervous system (CNS)” normalized cDNA libraries corresponding to mRNA extracted from each embryonic and larval stage as well as from adult visceral ganglia. The European project “Aquafirst”, notably devoted to genetic and functional genomic approaches for summer mortality resistance markers in oyster, produced 8,064 ESTs by suppression subtractive hybridization on six different tissues between Resistant and Sensitive oysters lines [26]. To maximize the utility of these collections, the ESTs together with those previously available from the MGE program [25] and from public databases (e.g. [27]) have been assembled in a unique public database: the GigasDatabase ([http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/)) containing 29,745 unique sequences.

This resource is highly valuable for identifying important gene networks controlling oyster physiological processes. It progresses the development of molecular markers for the establishment of a reference genetic map and allows large scale expression profiling experiments using microarray. These tools will be applied to further investigate and improve knowledge of the genetic and physiological bases of development, reproduction, immunology and associated processes with the aim to upgrade and manage oyster aquaculture. Finally, this work will be very useful for the annotation phase of the whole oyster genome, which represents the principal project of an international community of oyster biologists [28]. Indeed, the complete *C. gigas* genome sequence would provide a critical point of comparison for understanding the early diversification of animals and their genome, as it has been recently proposed for the gastropod snail *Lottia gigantea* (<http://genome.jgi-psf.org/Lotgi1/Lotgi1.home.html>).

## RESULTS and DISCUSSION

### *1. Generation of ESTs*

Firstly, to further valorize the recently published normalized cDNA libraries produced within the project “Marine Genomic Europe” program [25], we sequenced a novel part of the gonad library. Secondly, we also constructed two other directionally cloned normalized oyster cDNA libraries: one from all developmental stages from embryos to larvae and visceral ganglia cDNA, and one from bacteria-challenged and unchallenged hemocyte cDNA. Single-pass sequencing of the cDNA, which provided the sequence from the 5’ region of mRNA, was performed for each library, resulting in the production of 12,162 sequences, 13,191 sequences and 14,472 sequences respectively (Table 1).

In addition, to increase the number of characterized genes potentially involved in the molecular pathways associated with summer mortality [13, 14, 19], libraries were constructed from six different tissues (digestive gland, mantle-edge, hemocytes, gonad, muscle and gills) using Suppression Subtractive Hybridization (SSH) between Resistant (“R”) and Sensitive (“S”) oyster selected lines [26], in both sides of subtraction “R-S” and “S-R”. The generation of these SSH libraries has resulted in the production of a total of 8,064 sequences, with approximately 1,000 sequences per library (Table 1).

All the 47,889 recovered sequences were subjected to pre-processing in order to clean out poor quality sequences and to trim off vector sequences. After removal of clones with no or very short inserts and of poor sequence quality, a total of 40,845 (85.3%) high-quality ESTs were obtained with an average length of 413 bp (Table 1). All the ESTs have been released in GenBank with the accession numbers [AM857416-AM869575] for gonad library, [CU998430-CU999999; FP000001-FP012228] for hemocyte library, [CU983906-CU998429] for developmental stages and visceral ganglia library and [CU681473-CU681818 ; CU682012-CU682338 ; CU683068-CU683823 ; CU683828-CU683864 ; CU684729-CU686587 ; FP89705-FP89949] for the subtracted libraries.

### *2. Contig assembly of the ESTs*

The GigasDatabase ([http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/)) has been used for sequence processing, contig assembly, annotation and project data hosting. All sequences as well as other data and results, such as chromatograms, can be accessed through

the database, including public EST and mRNA sequences. After contig assembly of the new valid ESTs (40,845) added to the already published sequences from Genbank (9,548), the *C. gigas* valid sequences totaled 7,940 contigs and 21,805 singletons (Table 2). Thus, the database now contains 29,745 unique sequences with an average length of 798 bp; with the most abundant group of sequences having a sequence range 750-800 bp (Fig. 1).

Of the 7,940 contigs, 4,208 contained 2 ESTs (53%), 1,588 contained 3 ESTs (20%), 794 contained 4 ESTs (10%), 397 contained 5 ESTs (5%), and relatively few sequences contained more than 6 ESTs (11%) (Table 3). These results indicate that most of the clusters were small, reflecting a high efficiency in normalization of the cDNA libraries. Following EST sequence assembly into EST clusters, we calculated the number of novel EST clusters as a function of the number of clones sequenced, according to the different sequenced libraries. The result (Fig. 2) showed that each normalized library allowed the exponential improvement of novel EST in *C. gigas*. The extrapolation of this observed tendency showed that future EST sequencing would provide ever less novel sequences, until a plateau is reached where no more novelty will be found.

### 3. Putative identities of ESTs

In order to make an assessment for the putative identities of the sequences, all ESTs were subjected to BlastX similarity search on several protein databases. Of the 29,745 unique sequences, 12,790 (43%) had significant matches ( $E < 10^{-6}$ ) to the non redundant protein database. This percentage might be under-estimated because of ESTs within 3' untranslated regions (UTR), whose identities could not be revealed by similarity comparisons, and also because of relatively short length of sequence (about 360 bp) coming from the SSH libraries. The E-value distribution for all the annotated ESTs (Fig. 3) showed that 1,784 (6%) had an E-value of  $1e-100$  or less, showing therefore highly significant homology. About 65% of them had significant homology (E-values between  $1e-11$  and  $1e-99$ ) and are considered moderately similar. Finally, 32% of ESTs were assigned weak homology (E-values between  $1e-06$  and  $1e-10$ ) and are therefore less similar. Among the various organisms that have protein sequences in protein databases, the *C. gigas* ESTs available in the database had the highest number of BlastX hits to vertebrate sequences (Fig. 4). Interestingly, the first invertebrate sequences were from the cnidarian *Nematostela*, a species whose phylum is anterior to the emergence of bilaterian animals. Surprisingly, ecdysozoan sequences (insect and nematode sequences) displayed lower similarity (Fig. 4). Given the closer relatedness of

Lophotrochozoa and Ecdyzozoa both belonging to the superphylum Protostoma, it was expected *C. gigas* sequences would better match to insect sequences than to vertebrate sequences. Though these results must be balanced by the number of sequences deposited for each species in the databanks, they suggest that *C. gigas* and vertebrate transcriptomes display a lower rate of divergence from the urbilaterian (bilaterian ancestor) transcriptomes than ecdyzoan transcriptomes. This feature was already demonstrated at the intron and exon level for another Lophotrochozoan representative, the ragworm *Platinereis dumerilii* [29].

#### 4. Gene ontology annotation

More detailed functional annotation was performed with BlastX using KAAS (KEGG Automatic Annotation Server: <http://www.genome.jp/kegg/kaas/>), which provides a structured and controlled vocabulary to describe genes products according to four categories: Metabolism, Genetic information Processing, Environmental information Processing and Cellular Processes. GO categories were successfully assigned to 7,733 (26%) unique ESTs. This low percentage of GO assignment has also been reported by Tanguy *et al.* [25] and is probably linked to a high level of amino acid sequence divergence between invertebrates and the reference taxa currently used in genomics (such as FlyBase, WormBase ...), and also to the relatively small average length of the ORFs. Table 4 shows the percentage distribution of gene ontology terms among the annotated ESTs. The largest number of annotated sequences was found for a final GO term “Metabolism” which represents 42% of the annotated ESTs among all GO categories. Among this category, the higher GO terms were Amino Acid, Carbohydrate and Lipid metabolism, with 8, 7.6 and 6.3 % of the annotated ESTs respectively. For “Genetic Information Processing”, 4.3 and 4.8% of the annotated ESTs were associated with translation and folding, and sorting degradation respectively. A large number of ESTs (10.7%) was linked to signal transduction, in the “Environmental Information Processing” category. Finally, cell communication (7.0%), endocrine system (7.9%) and immune system (4.9%) were the most abundant “Cellular Processes” subterms.

#### 5. *in silico* markers

A total of 208 *in silico* microsatellites were identified in the 29,745 unique EST sequences using Msatfinder. The major types of microsatellites were dinucleotide (158) and then trinucleotide (22) (Table 5). Of the 208 ESTs containing microsatellites, 173 (83.2%) have

sufficient flanking sequences for primer design. From these, a first set of 18 microsatellite markers [23] have been recently developed (primer design, amplification conditions, level of polymorphism) and are currently used for genetic linkage mapping and QTL analysis. There is still a great potential for the development of more microsatellite markers for which polymorphism can be tested in specific resource families [30]. *in silico* single nucleotide polymorphisms (SNPs) have recently become the marker type of choice for linkage and QTL analysis [31]. In most cases, SNPs have relied on genomic sequencing, BAC end sequencing, or targeted SNP discovery. In *C. gigas*, protein polymorphism has been found to be one of the highest recorded among animals with an average heterozygosity above 20%, corresponding to three to four times the mammalian average [32]. This high polymorphism was also reported in an analysis of *C. gigas* BAC libraries and was explained to be due to genome duplication rather than simple allelic variation [3].

A total of 7,530 putative SNPs were identified including 1,344 non synonymous and 5,097 synonymous mutations and 1,089 indels (Table 6). These SNPs represented a rate of 1 SNP per 75 base pairs, a little bit lower than the frequency of one SNP every 60 base pairs in coding regions already reported by [21] and [33], but higher than the one described in *C. virginica*, displaying a rate of one SNP every 170 base pairs [34]. These SNPs will also be used for further linkage mapping and population genetic studies to detect putative selective effects in coding regions of genes regulated by environmental factors. However, validation and polymorphic analysis must be performed before these putative SNPs can be used. Indeed, a large proportion of SNPs were identified from contigs with just a few sequences: we will then have to differentiate the true SNPs from sequencing errors.

#### *6. ESTs as a tool for a comparative and integrative approach of physiological regulatory networks*

In the context of improvement of aquaculture of *C. gigas*, substantial effort has been made recently towards the targeted characterization of genes potentially connected to relevant physiological functions of the oyster such as growth, development, reproduction, nutrition, energy metabolism, as well as immunity. Though risky and time consuming, this approach turned out very fruitful (e.g [10, 11, 19, 33, 35, 36]). An additional focus of this study (Table 7) was the identification of genes encoding putative extracellular signaling molecules and/or their receptors, as they constitute genuine integrative links between the different physiological functions of an organism, or genes encoding effectors (e.g. signaling pathway molecules,

transcription factors or secretory proteins) since they are in charge of the biological response of a cell (or an organ) to a given situation.

The present high throughput sequencing assignment not only nicely completes the gaps between fragmentary data but also offers the opportunity to investigate physiological functions in a more integrative way considering gene networks as pertinent tools. Below are examples of how the new sequence data properly complete patchy schemes of regulatory networks of interest for our research interests concerning (I) TGF- $\beta$  signaling, (II) signals linking energy balance and reproduction, and (III) immunity components in *C. gigas*.

### *6.1 TGF- $\beta$ signaling in the Lophotrochozoan Crassostrea gigas*

An illustration of the accuracy and the quality of the new *C. gigas* genomic resource is the identification of various novel components of the TGF- $\beta$  signaling (Fig. 5), a transduction pathway already well characterized in *C. gigas*, regulating a variety of important processes [11, 37, 38]. Thus two new ligands, activin/myostatin and inhibin-like, were identified and complete the already large panel of ligands in this species. Interestingly a variety of regulators were also characterized including ligand binding proteins and their specific proteases, the kinase deficient decoy receptor “BAMBI” (BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor), the intracellular signaling components as Cg-Smad 4 and their inhibitor Cg-Smurf (Smads ubiquitin regulatory factors) as well as transcription cofactors as Cg-Snip1 (Smad nuclear interacting protein 1). Altogether, this new picture makes the TGF- $\beta$  signaling pathway one of the best-characterized systems at the molecular level among lophotrochozoans. This signaling pathway demonstrates an early evolutionary origin with a significant complexity corresponding to, as established in vertebrates, a plethora of ligands, a limited set of cognate receptors and smad transducing proteins, and a diversity of upstream and downstream regulators. This is an example of how the high degree of sequence information reached by this study offers the opportunity to investigate evolution of regulatory networks via the determination of the biochemical interactions between candidate components and the identification of the life processes they are associated with.

### *6.2 Regulatory signals linking energy balance and reproduction in Crassostrea gigas*

In the complex summer mortality syndrome, it has been demonstrated that reproduction allocation should play a crucial role in the capacity of oyster to survive to summer mortality

[13, 19]. In this context, the acquisition of knowledge in the regulation networks of reproduction appears of prime importance. This new *C. gigas* genomic resource has allowed the identification of some relevant genes involved in the signaling pathways that link reproduction to energy balance: genes putatively encoding the PI3-kinase enzyme, leptin and insulin receptors, the adiponectin, the neuropeptide Y ligand and two different receptors all included as “energy-metabolism-reproduction” candidates in Figure 6. Such signaling molecules were recently identified in vertebrates and have compelling regulatory effect on reproduction (e.g. [39, 40]). This holds true for adipokines such as leptin and adiponectin, which promote reproduction (fecundity, growth of germinal cells) by increasing the utilisation of oxidizable fuels, and neuropeptide Y that inhibits reproduction when energy storage is deficient [41, 42]. These molecules act through the modulation of PI3-kinase, the major component of the insulin/IGF signaling pathway, and AMP-kinase, involved in mitochondrial oxidation as illustrated by the schematic in figure 6.

### 6.3 Innate immunity components in Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Oysters inhabit environments where they must protect themselves from an array of pathogenic organisms that share the same ecological niches. Like other invertebrates, the oyster immune system relies on an innate system [9, 43]. The hemocytes, immune competent cells, and humoral defense factors operate in a coordinated way to control and equilibrate the microflora and, finally kill and eliminate infecting bacteria. In this context, this *C. gigas* genomic resource contributes to the identification of new immune system components including signal transduction elements; LPS binding proteins, antimicrobial peptides and various protease inhibitors and proteases. In particular, one new component of NF- $\kappa$ B pathway, Toll receptor like, was sequenced, leading in *C. gigas* to seven cDNAs homologous to components of the Rel/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway [44]. The most significant feature of the NF- $\kappa$ B pathway is the central role on the NF- $\kappa$ B family of transcriptional activator proteins, ubiquitously expressed and involved in wide variety of biological processes including inflammation, cell proliferation and differentiation in mammals as well as development in insects [45]. Further investigations should focus on functional studies to demonstrate the involvement of this pathway in physiological processes and more particularly in immune mechanisms in oyster. In addition, antimicrobial peptides are important components of the innate immune system that have been conserved during evolution [46]. Through this new resource, new isoforms of defensins and proline rich peptides were identified. These peptides

were previously proposed, together with the antibacterial protein Cg-BPI [47], to be involved in the first line of defense of *C. gigas* oysters [48, 49]. Additionally, a peptide member of the big defensin antimicrobial peptide family [50] was identified for the first time in an oyster.

## CONCLUSION

In conclusion, the GigasDatabase provides a large set of well characterized clones for future studies. Indeed, *Crassostrea gigas*, which belongs to the Lophotrochozoans, the large though understudied third clade of bilaterian animals, represents a rare non-model species for which the genomic resource available turns out to be very consistent. Several research teams are now using this important sequence information to examine oyster gene expression profiles in various experimental and environmental constraints.

## MATERIAL AND METHODS

### *1. Biological samples*

#### *1.1. Resistant and Sensitive oysters for the subtractive libraries*

Resistant (R) and Susceptible (S) families, selected for high or low survival to summer mortality following divergent selection design were produced in the Ifremer hatchery in La Tremblade (France) [26]. Juvenile oysters were then transferred to the nursery of Bouin (Vendée, France) until March 2005 for on-growing and were then deployed in the field at Fort Espagnol (South Brittany, France). Two sampling dates (25th of May and 6th of June 2005) were chosen. For each tissue (gonad, muscle, digestive gland, hemocytes, mantle-edge, and gills), pools of 24 oysters were sampled, for R and S lines, corresponding to 12 oysters per date.

#### *1.2. Biological material for “All developmental stages and Central Nervous System” cDNA library*

Wild mature oysters, collected on the Atlantic coast of Brittany (France), were used for experimental breeding. All steps of fertilization and rearing were realized as described in Fabioux *et al.* [35]. Various developmental stages, identified microscopically, were sampled:

oocytes before fertilization, 4-cell and 8-cell embryos (1 and 2 hours post-fertilization [hpf], respectively), morulas (3 hpf), blastulas (5 hpf), gastrulas (7 hpf), trochophore larvae (16 hpf) and D-larvae (2 dpf), early veliger larvae (7 dpf), later veligers larvae (14 dpf), pediveligers larvae (18 dpf), and larvae after fixation (27 dpf). One million oysters from each developmental stage from oocyte to trochophore, and 250,000 from later stages, were sampled for total RNA extraction. On 10 wild oysters, the visceral ganglia were microscopically dissected.

### *1.3. Biological material for “hemocytes” cDNA library*

Hemocytes were sampled from adult oysters in 24 experimental conditions (total of 144 oysters), which include four kinds of bacterial challenges, at two times post challenge and from oysters of three geographic origins (6 oysters per location): Atlantic coast (La Tremblade), Normandie (Bay des Veys) and Mediterranean (Thau lagoon). The four kinds of bacterial challenges performed by immersion were (I) alive non-virulent *Micrococcus luteus* and *Vibrio tasmaniensis* ( $2.5 \times 10^8$  bacteria / L for each strain), (II) alive virulent *Vibrio splendidus* ( $5 \times 10^8$  bacteria / L), (III) mix of heat killed virulent *Vibrio splendidus* and *Vibrio aesturianaus* ( $2.5 \times 10^8$  bacteria / L for each strain) and (IV) unchallenged oysters. For each condition, hemolymph was collected at two times post challenge (12 and 24h) from the pericardial cavity through the adductor muscle. After hemolymph collection, hemocytes were isolated by centrifugation at 700g for 10 min (4 C) to discard plasma. Hemocytes were further treated according to different experimental procedures (see below).

### *2. RNA preparation*

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Gibco BRL) at a concentration of 1 ml/30 mg of tissues. For SSH experiments and hemocyte samples, polyadenylated RNA was isolated using the Quickprep micro mRNA purification kit (Amersham). RNA concentration were measured with a spectrophotometer at 260 nm using the conversion factor 1 OD = 40  $\mu$ g/ml RNA, and RNA quality was checked by using the Bioanalyser 2100 (Agilent).

### *3. cDNA library construction and sequencing of the clones*

#### *3.1. Construction of oyster “hemocytes” cDNA library*

The cDNA library was built by GATC Biotech AG (Germany). In brief, total RNA (1 µg) from oyster hemocytes of the different experimental conditions was used for ds cDNA synthesis. The normalization method consists of denaturation and controlled, incomplete reassociation of double stranded cDNA, followed by selectively cloning of the cDNA corresponding to the normalized fraction. Efficiency of normalization was checked by non radioactive Reverse Northern blot analysis of normalised and non-normalised cDNA. Additionally, an array containing randomly selected clones derived from the non-normalized cDNA library was hybridized with normalized and non-normalized cDNA. Normalized cDNA was then amplified, directionally cloned into pBluescriptIISK(+) plasmid (Stratagene) and was used to transform E. coli XL1-BlueMRF' (Stratagene) to generate a normalized cDNA library of  $8.3 \times 10^4$  independent clones.

#### *3.2. Construction of “All Developmental stages and central nervous system” cDNA library*

Total RNA (0.3 µg) from various developmental stages and visceral ganglia was used for ds cDNA synthesis and amplification using SMART approach. Recovered cDNAs were normalized using DNS normalization method [51]. Efficiency of normalization was checked on a cDNA sample before and after normalization by real-time PCR using elongation factor [35] and actin [52]. Resulting normalized cDNA was then amplified, directionally cloned into pAL17.3 plasmid (Evrogen, Moscow) and was used to transform XL1-Blue E. coli strain (Stratagene) to generate a cDNA library of  $5 \times 10^5$  independent clones.

#### *3.3. Construction of subtractive libraries*

The mRNA from each pool of tissue RNA was used as the template for SSH following the PCR-select cDNA subtraction kit procedure (Clontech). Hybridization and subtraction steps were carried out in both directions, i.e. for forward subtraction the R sample (tester) was subtracted with the S sample (driver) and vice versa for reverse subtraction. The PCR

products from both subtractions were cloned into pCR 2.1 ® TOPO plasmid using TOP10 One Shot ® competent cells for transformation (Invitrogen).

### *3.4. Sequencing*

For subtracted libraries and the normalized cDNA gonad library, the clones were sequenced at the Max Planck Institute platform (Berlin, Germany) using a capillary sequencer system ABI 3730 XL, sequencing kit ABI BigDye Terminator and universal primer.

For the two other normalized cDNA libraries, the sequencing of the clones was performed at the Genoscope (CEA Evry, France) using an ABI 3730 automatic capillary sequencer and the ABI BigDye Terminator v.3.1 sequencing kit.

### *4. Sequence analysis and contig assembly*

ESTs were cleaned from vector and plasmid sequences and sequences containing contaminants such as E. coli, Yeast, Mitochondria, Ribosome were removed from the analysis using Univec sequence repository. Valid sequences, that had a PHRED score over 20 on at least 100 bp, were submitted to the EMBL-EBI Nucleotide Sequence database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). An assembly process was initiated to produce contigs from the partial cDNA sequences. Because of the large number of sequences to be assembled, this was done in a two-step process. The first step built clusters of sequences sharing at least 75 bp with an identity rate of 96% (with MegaBlast). The second step constructed coherent contigs from the previous clusters (with CAP3, used at the recommended stringency: 40 bp overlap with 90% sequence identity). This last step has also created the consensus sequences of the pseudo-gene. Once the contigs were built and their annotation completed, all data were loaded in a locally adapted Ensembl database. A graphical user interface permits the visualization of the data with different views, such as “Graphical view” which gives a graphical overview of the contig structure and similarity annotations. Each sequence or similarity feature is represented as a line. The color of the line gives an indication about the type of sequence and all the lines are described on the left of the panels.

In order to provide as much information as possible about the contigs, similarity searches were performed. This was done using different databases to which the contig sequences were compared. The databases used were UniProt / SwissProt, UniProt / TrEMBL, ProDom (protein domains), UniGene Human Clusters, UniGene taxon specific Clusters, TIGR Taxon

Specific Clusters, Ensembl specific transcripts (cDNA) and other Sigenae Contigs. Annotations were then loaded in the GigasDatabase. Open reading frames (ORFs) were identified by choosing the longest possible translation into amino acid sequence, using Emboss sixpack. Sequences with an ORF smaller than 100 codons (300 bp) were removed from the dataset.

### *5. Gene ontology annotation*

To link ESTs with BlastX hits with putative gene function, all identified genes were annotated according to the gene ontology (GO) terms by using the program KAAS (KEGG Automatic Annotation Server: <http://www.genome.jp/kegg/kaas/>) which provides functional annotation of genes by Blast comparisons (single best hit) against the manually curated KEGG Genes database [53]. The KEGG (eukaryotic) pathways are organized into four general categories: Metabolism, Genetic Information Processing, Environmental Information Processing and Cellular Processes. The distribution of genes in each of the main ontology categories was examined and the percentages of unique sequence in each of the assigned GO terms were computed.

### *6. in silico mining of microsatellites and SNPs*

A set of 56,327 unique sequences was submitted to a search for microsatellite markers using SRR finder ([http://www.maizemap.org/bioinformatics/SSRFINDER/SSR\\_Finder\\_Download.html](http://www.maizemap.org/bioinformatics/SSRFINDER/SSR_Finder_Download.html); [54]) with a minimum repeat of 4. This provided a table of raw data which was then exported to MS Excel ® to calculate the number of di-, tri-, and tetra nucleotides repeats, their respective length and the starting positions. Putative SNPs were detected using the Pupasuite v1.0 (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es/>, [55]). The 56,327 ESTs were assembled in 7,940 contigs where putative SNPs were identified and characterized to calculate the percentage of each kind of mutation (ts/tv, synonymous/non-synonymous).

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

EF, PF and AH assisted in data analysis and manuscript preparation. AH, JS, PF and GD did the construction of the SSH. FM worked on software design, carried out development, implementation and data processing. CK in addition supervised the web design. VB, dLJ, YG and EB worked on the hemocyte libraries and on the immune data.

PF, PB, AH, DM, AT and PP coordinated the involved projects (Aquafirst, Marine Genomics Europe and Genoscope). RR, FG and PW performed the sequencing of the cDNA libraries. CS and SL worked on the detection of in silico markers. All authors read and approved the final manuscript.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The research presented in this paper was performed within the framework of several research projects funded by: Genoscope (11/AP2006-2007), Marine Genomics Network of Excellence (GOCE-CT-2004-505403), the European project "Aquafirst" (513692) in the Sixth Framework Program, ANR CgPhysiogène (ANR-06-GANI-009)

All sequence analyses were conducted in collaboration with the SIGENAE bioinformatics team. Specific requests for EST sequence chromatograms should be addressed at [sigenaesupport@jouy.inra.fr](mailto:sigenaesupport@jouy.inra.fr).

## REFERENCES

1. Hubert S, Hedgecock D: **Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas***. *Genetics* 2004, **168**(1):351-362.
2. Li L, Guo X: **AFLP-based genetic linkage maps of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)**. *Mar Biotechnol* 2004, **6**(1): 26-36.
3. Cunningham C, Hikima J, Jenny MJ, Chapman RW, Fang GC, Sasaki C, Lundqvist ML, Wing RA, Cupit PM, Gross PS *et al*: **New resources for marine genomics: bacterial artificial chromosome libraries for the Eastern and Pacific oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*)**. *Mar Biotechnol (NY)* 2006, **8**(5):521-533.
4. McKillen DJ, Chen YA, Chen C, Jenny MJ, Trent HF, 3rd, Robalino J, McLean DC, Jr., Gross PS, Chapman RW, Warr GW *et al*: **Marine genomics: a clearing-house for genomic and transcriptomic data of marine organisms**. *BMC Genomics* 2005, **6**(1):34.
5. Saavedra C, Bachère E: **Bivalve genomics**. *Aquaculture* 2006, **256**(1-4):1-14.
6. Hedgecock D, Lin JZ, DeCola S, Haudenschild CD, Meyer E, Manahan DT, Bowen B: **Transcriptomic analysis of growth heterosis in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(7):2313-2318.
7. Jenny MJ, Chapman RW, Mancina A, Chen YA, McKillen DJ, Trent H, Lang P, Escoubas JM, Bachere E, Boulo V *et al*: **A cDNA microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas***. *Mar Biotechnol (NY)* 2007, **9**(5):577-591.
8. Ruesink JL, Lenihan HS, Trimble AC, Heiman KW, Micheli F, Byers JE, Kay MC: **Introduction of non-native oysters: Ecosystem effects and restoration implications**. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* (2005) **36**:643-689
9. 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.
10. Badariotti F, Lelong C, Dubos MP, Favrel P: **Characterization of chitinase-like proteins (Cg-Clp1 and Cg-Clp2) involved in immune defence of the mollusc *Crassostrea gigas***. *Febs J* 2007, **274**(14):3646-3654.
11. Lelong C, Badariotti F, Le Quere H, Rodet F, Dubos MP, Favrel P: **Cg-TGF-beta, a TGF-beta/activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved**

- in immunity against Gram-negative microbial infection.** *Dev Comp Immunol* 2007, **31**(1):30-38.
12. Gaffney P, M., Bushek D: **Genetic aspects of disease resistance in oysters.** *Journal of Shellfish research* 1996, **15**:135-140.
  13. Samain JF, Dégremont L, Soletchnik P, Haure J, Bédier E, Ropert M, Moal J, Huvet A, Bacca H, Van Wormhoudt A *et al*: **Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process.** *Aquaculture* 2007, **268**(1-4):227-243.
  14. 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):211-220.
  15. Lang P, Langdon CJ, Camara MD: **Predicting the resistance of adult pacific oysters (*Crassostrea gigas*) to summer mortality.** *Journal of Shellfish research* 2008, **27**:470-470.
  16. Boutet I, Tanguy A, Moraga D: **Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions.** *Gene* 2004, **329**:147-157.
  17. Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D: **Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure.** *Febs J* 2005, **272**(2):390-403.
  18. Badariotti F, Kypriotou M, Lelong C, Dubos MP, Renard E, Galera P, Favrel P: **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* 2006, **281**(40):29583-29596.
  19. Fleury E, Fabioux C, Lelong C, Favrel P, Huvet A: **Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*.** *Gene* 2008, **410**(1):187-196.

20. Wang Y, Xu Z, Guo X: **Differences in the rDNA-bearing chromosome divide the Asian-Pacific and Atlantic species of *Crassostrea* (Bivalvia, Mollusca).** *Biol Bull* 2004, **206**(1):46-54.
21. Sauvage C, Bierne N, Lapegue S, Boudry P: **Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.** *Gene* 2007, **406**(1-2):13-22.
22. Lopez-Flores I, de la Herran R, Garrido-Ramos MA, Boudry P, Ruiz-Rejon C, Ruiz-Rejon M: **The molecular phylogeny of oysters based on a satellite DNA related to transposons.** *Gene* 2004, **339**:181-188.
23. Sauvage C, Boudry P, Lapegue S: **Identification and characterization of 18 novel polymorphic microsatellite makers derived from expressed sequence tags in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.** *Molecular Ecology Resources* 2008 (in press).
24. Dupont S, Obst M, Wilson K, Sköld H, Nakano H, Thorndyke MC: **Marine Ecological Genomics – When Genomics meet Marine Ecology.** *Marine Ecology Progress Series* 2007, **332**:257-273.
25. Tanguy A, Bierne N, Saavedra C, Pina B, Bachere E, Kube M, Bazin E, Bonhomme F, Boudry P, Boulo V *et al*: **Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution.** *Gene* 2008, **408**(1-2):27-36.
26. Samain JF, McCombie H: **Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project.**, Quae edn; 2008.
27. Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguiere C, Girardot AL, 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.
28. Hedgecock D, Gaffney P, M., Gouletquer P, Guo X, Reece K, Warr G, W.: **The case for sequencing the Pacific oyster genome.** *Journal of Shellfish research* 2005, **24**(2):429-441.
29. Raible F, Tessmar-Raible K, Osoegawa K, Wincker P, Jubin C, Balavoine G, Ferrier D, Benes V, de Jong P, Weissenbach J *et al*: **Vertebrate-type intron-rich genes in the marine annelid *Platynereis dumerilii*.** *Science* 2005, **310**(5752):1325-1326.
30. Yu H, Li Q: **Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*).** *J Hered* 2008, **99**(2):208-214.

- 31 Rafalski A: **Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics.** *Curr Opin Plant Biol* 2002, **5**(2):94-100.
32. Hedgecock D, Sly F: **Genetic drift and effective population sizes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.** *Aquaculture* 1990, **88**:21-38.
33. Curole JP, Hedgecock D: **Estimation of preferential pairing rates in second-generation autotetraploid pacific oysters (*Crassostrea gigas*).** *Genetics* 2005, **171**(2):855-859.
34. Quilang J, Wang S, Li P, Abernathy J, Peatman E, Wang Y, Wang L, Shi Y, Wallace R, Guo X *et al*: **Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers.** *BMC Genomics* 2007, **8**:157.
35. Fabioux C, Huvet A, Lelong C, Robert R, Pouvreau S, Daniel JY, Minguant C, Le Pennec M: **Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **320**(2):592-598.
36. Tirape A, Bacque C, Brizard R, Vandembulcke F, Boulo V: **Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis.** *Dev Comp Immunol* 2007, **31**(9):859-873.
37. Herpin A, Lelong C, Becker T, Rosa F, Favrel P, Cunningham C: **Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway.** *Febs J* 2005, **272**(13):3424-3440.
38. Lelong C, Mathieu M, Favrel P: **Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*.** *Eur J Biochem* 2000, **267**(13):3986-3993.
39. Schneider JE: **Energy balance and reproduction.** *Physiol Behav* 2004, **81**(2):289-317.
40. Schneider JE: **Metabolic and hormonal control of the desire for food and sex: implications for obesity and eating disorders.** *Horm Behav* 2006, **50**(4):562-571.
41. Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M: **Novel signals for the integration of energy balance and reproduction.** *Mol Cell Endocrinol* 2006, **254-255**:127-132.
42. Wade GN, Jones JE: **Neuroendocrinology of nutritional infertility.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, **287**(6):R1277-1296.

43. Glinski Z, Jarosz J: **Molluscan immune defenses**. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1997, **45**(2-3):149-155.
44. Montagnani C, Labreuche Y, Escoubas JM: **Cg-IkappaB, a new member of the IkappaB protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas***. *Dev Comp Immunol* 2008, **32**(3):182-190.
45. Ghosh S, May MJ, Kopp EB: **NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses**. *Annu Rev Immunol* 1998, **16**:225-260.
46. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ: **Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal**. *Trends Immunol* 2002, **23**(6):291-296.
47. Gonzalez M, Gueguen Y, Destoumieux-Garzon D, Romestand B, Fievet J, Pugniere M, Roquet F, Escoubas JM, Vandebulcke F, Levy O *et al*: **Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(45):17759-17764.
48. Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, Garnier J, Fievet J, Escoubas JM, Bulet P, Gonzalez M, Lelong C, Favrel P *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):313-323.
49. Gueguen Y, Romestand B, Fievet J, Schmitt P, Destoumieux-Garzon D, Vandebulcke F, Bulet P, Bachere E: **Oyster hemocytes express a proline rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin**. *Mol Immunol* 2008:in press.
50. Zhao J, Song L, Li C, Ni D, Wu L, Zhu L, Wang H, Xu W: **Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein**. *Mol Immunol* 2007, **44**(4):360-368.
51. Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekov GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA *et al*: **Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease**. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(3):e37.
52. Huvet A, Daniel JY, Quéré C, Dubois S, Prudence M, Van Wormhoudt A, Sellos D, Samain JF, Moal J: **Tissue expression of two alpha-amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effect of two different food rations**. *Aquaculture* 2003(228):321-333.

53. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M: **KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server**. *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(Web Server issue):W182-185.
54. Rungis D, Berube Y, Zhang J, Ralph S, Ritland CE, Ellis BE, Douglas C, Bohlmann J, Ritland K: **Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea spp.*) from expressed sequence tags**. *Theor Appl Genet* 2004, **109**(6):1283-1294.
55. Conde L, Vaquerizas JM, Dopazo H, Arbiza L, Reumers J, Rousseau F, Schymkowitz J, Dopazo J: **PupaSuite: finding functional single nucleotide polymorphisms for large-scale genotyping purposes**. *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(Web Server issue):621-625.

Table 1: Summary statistics of the Pacific oyster cDNA libraries.

Description	Tissue	Vector used	No. of sequences retrieved	No. of valid sequences	Average lenght insert (bp)
cDNA gonad *	gonad	PAL32CV	12162	8809	511
cDNA embryos and larvae and central nervous system (GENOSCOPE)	embryos, larvae, CNS	pAL17.3	13191	12730	618
cDNA hemocytes (GENOSCOPE)	hemocyte	pBluscriptII SK+	14472	13773	415
cDNA digestive gland subtracted library (AQUAFIRST)	digestive gland	PCR2.1	1536	1362	428
cDNA mantle-edge subtracted library (AQUAFIRST)	mantle-edge	PCR2.1	1536	1343	405
cDNA hemocyte subtracted library (AQUAFIRST)	hemocyte	PCR2.1	1152	125	291
cDNA gonad subtracted library (AQUAFIRST)	gonad	PCR2.1	768	559	382
cDNA muscle subtracted library (AQUAFIRST)	muscle	PCR2.1	1536	1117	312
cDNA gills subtracted library (AQUAFIRST)	gills	PCR2.1	1536	1027	359
Total			47889	40845	Mean : 413

\* Library already partly published in Tanguy *et al.*[25].

Table 2: Summary statistics of the ESTs generated from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* available in the GigasDatabase.

Feature	Value
Number of high quality ESTs (new ESTs + public)	56327 (40845 + 15482)
Average length of high quality ESTs (bp)	798
Number of contigs	7940
Number of ESTs in contigs	34522
Number of singletons	21805
Number of unique sequences	29745

Table 3: BlastX searches and contig analysis for the complete collection of oyster contigs, based on GigasDatabase EST clustering.

Number of unique sequences	29745
Number of unique sequences with BlastX hits	11450
Percentage of unique sequences with BlastX hits	43%
Number of contigs containing:	
2 ESTs	4208
3 ESTs	1588
4 ESTs	794
5 ESTs	397
> 6 ESTs	873

Table 5: *in silico* microsatellite (Msat) mining of the GigasDatabase.

Percentage represents the percentage of each kind of repeated motif.

	Number of Msat	Percentage
Total	208	100
Dinucleotide	158	76.0
Trinucleotide	22	10.6
Tetranucleotide	18	8.7
Pentanucleotide	10	4.8

Table 6: Putative Single Nucleotide Polymorphism (SNP) identification from the GigasDatabase.

Indels are Insertions and Deletions detected in the sequences with a range of 1 to 13 bases

Two distinct subcategories of SNP have been identified:

- Transition ( $t_s$ ) *e.g.* A ↔ G; T ↔ C that are mutations between two puric bases (A/G) or between two pyrimidic bases (C/T)

- Transversion ( $t_v$ ) *e.g.* A ↔ C; A ↔ T; T ↔ G; G ↔ C that are mutations between puric and pyrimidic bases

Trinucleotides are polymorphic sites that show three alleles at the same locus

SNP Type	Number	Percentage
Non Synonymous	1344	17.85
Synonymous	5097	67.69
Indel	1089	14.46
A/G	1860	36.49
T/C	1494	29.31
A/C	551	10.81
A/T	284	5.57
T/G	381	7.47
G/C	518	10.16
TriNucleotides	9	0.18
Total	7530	100

Table 4: Gene ontology annotation using the KEGG Automatic Annotation Server for the unique *Crassostrea gigas* sequences from the GigasDatabase.

“Number ESTs” indicates the number of ESTs associated in the corresponding Gene Ontology, and “%” the corresponding percentage.

<b>Categories</b>	<b>Number ESTs</b>	<b>%</b>
<b>Metabolism</b>	<b>3244</b>	<b>41.9</b>
Carbohydrate Metabolism	590	7.6
Energy Metabolism	302	3.9
Lipid Metabolism	484	6.3
Nucleotide Metabolism	153	2.0
Amino Acid Metabolism	619	8.0
Metabolism of Other Amino Acids	171	2.2
Glycan Biosynthesis and Metabolism	273	3.5
Biosynthesis of Polyketides and Nonribosomal Peptides	4	0.1
Metabolism of Cofactors and Vitamins	173	2.2
Biosynthesis of Secondary Metabolites	117	1.5
Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	355	4.6
<b>Genetic Information Processing</b>	<b>954</b>	<b>12.3</b>
Transcription	76	1.0
Translation	335	4.3
Folding, Sorting and Degradation	370	4.8
Replication and Repair	173	2.2
<b>Environmental Information Processing</b>	<b>1096</b>	<b>14.2</b>
Membrane Transport	82	1.1
Signal Transduction	830	10.7
Signaling Molecules and Interaction	184	2.4
<b>Cellular Processes</b>	<b>2439</b>	<b>31.5</b>
Cell Motility	188	2.4
Cell Growth and Death	324	4.2
Cell Communication	544	7.0
Endocrine System	611	7.9
Immune System	381	4.9
Nervous System	160	2.1
Sensory System	90	1.2
Development	137	1.8
Behavior	3	0.0
<b>Total</b>	<b>7733</b>	<b>100</b>

Table 5: Selection of some candidate *Crassostrea gigas* ESTs similar to genes potentially involved in physiological regulatory networks.

	Accession No	Best hit description
Endo-paracrine controls	CU997995	activin/myostatin like
	CU984230	inhibin bA like
	CU998397, CU990571	smad
	CU994284, CU991852, CU987529, CU984099, CU991056	follistatin 1
	CU998185, CU991852, CU983909, CU993729, CU987283, CU993729, CU988008	thrombospondin
	FP011148	cysteine rich bmp regulator 2
	CU997999	tolloid-like protein
Energy metabolism/reproduction	FP001644, FP008029, FP008849, FP002487, CU984370, CU989738, CU997056	c1q-like adipose specific protein
	FP000698	leptin receptor overlapping transcript-like 1
	FP010154, FP001573, CU993420, CU991531	ovary-specific c1q-like factor
	FP008650	phosphatidylinositol 3-kinase p110 beta
	CU994294, CU990696	acetyl-coenzyme a carboxylase alpha
	CU994253	adiponectin receptor 1
	CU993735	camp-dependent protein kinase
	CU993270	carnitine o-acyltransferase
	CU983945, FP005412, CU994912	neuropeptide y
	CU991233, CU682842	sterol regulatory element binding factor 1
Immunity	FP006535, FP010171, CU984422, FP005108, CU998652	caspase
	CU683654	cactus
	CU999108, CU988309, CU993827	myeloid differentiation primary response gene
	FP004666, FP011576, FP002604, CU995719	toll
	CU989449, FP009504, CU998458, CU988135	kappa-b
	CU684230	big defensin
	FP010905	gigasins 2 protein
	FP000856, FP003629, FP006010, FP006279, CU994639	lbp bpi
	FP005503, CU999465, FP006037, FP011761	lipopolysaccharide binding protein
	CU983947, CU996720, FP002226	lps-induced tn factor

Figure 1: Distribution of the size of ESTs available in GigasDatabase. Hits represent the number of unique sequences.

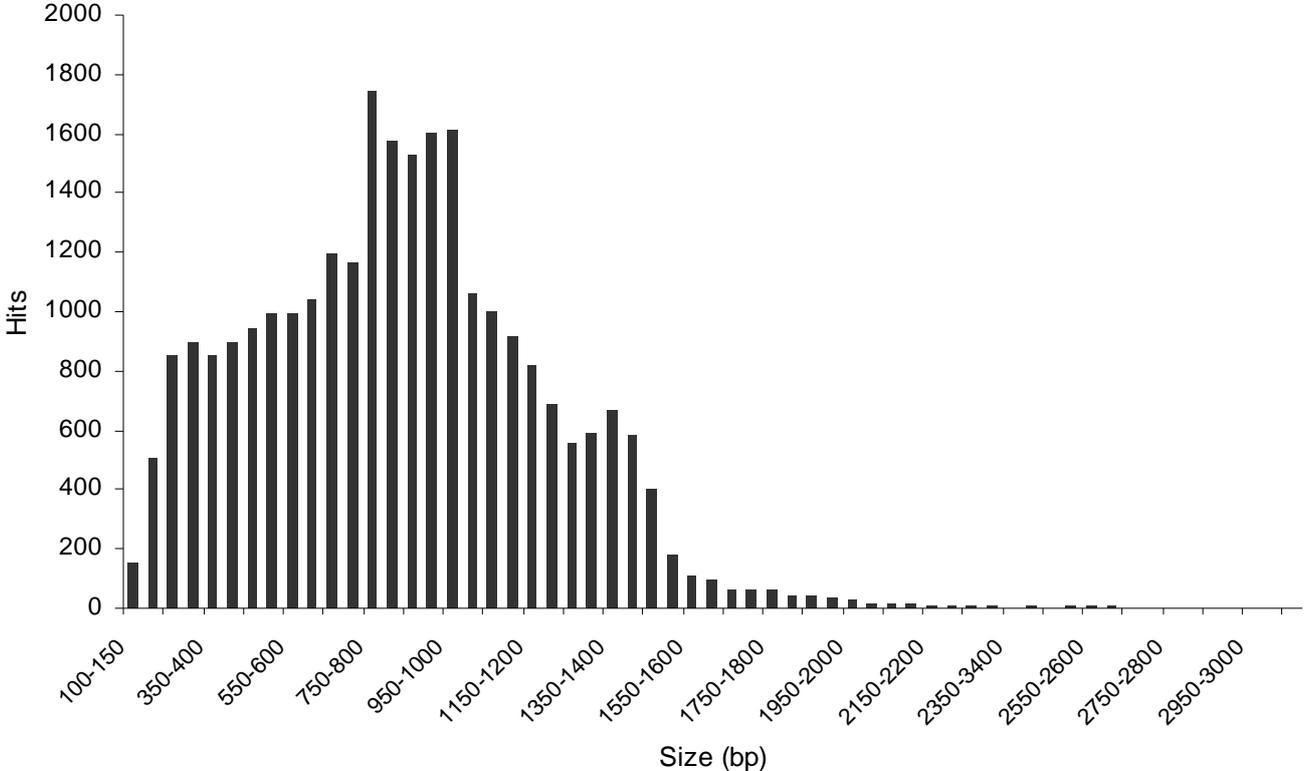


Figure 2: Number of novel ESTs found as a function of the number of clones sequenced in each oyster cDNA library.

“MGE + public data”: ESTs from Marine Genomics Europe (MGE) Network of Excellence (Tanguy *et al.*, 2008) and from public database (Genbank)

“Aquafirst SSH libraries”: 5,533 valid ESTs from 12 subtracted libraries between Resistant and Sensitive oyster lines

“All developmental stages and CNS cDNA library”: 12,730 valid ESTs from all developmental stages from embryos to larvae and visceral ganglia

“Hemocytes cDNA library”: 13,773 valid ESTs from bacteria-challenged and unchallenged hemocytes

“Gonad cDNA library”: 8,809 valid ESTs from male and female gonad at various stages of reproductive cycle

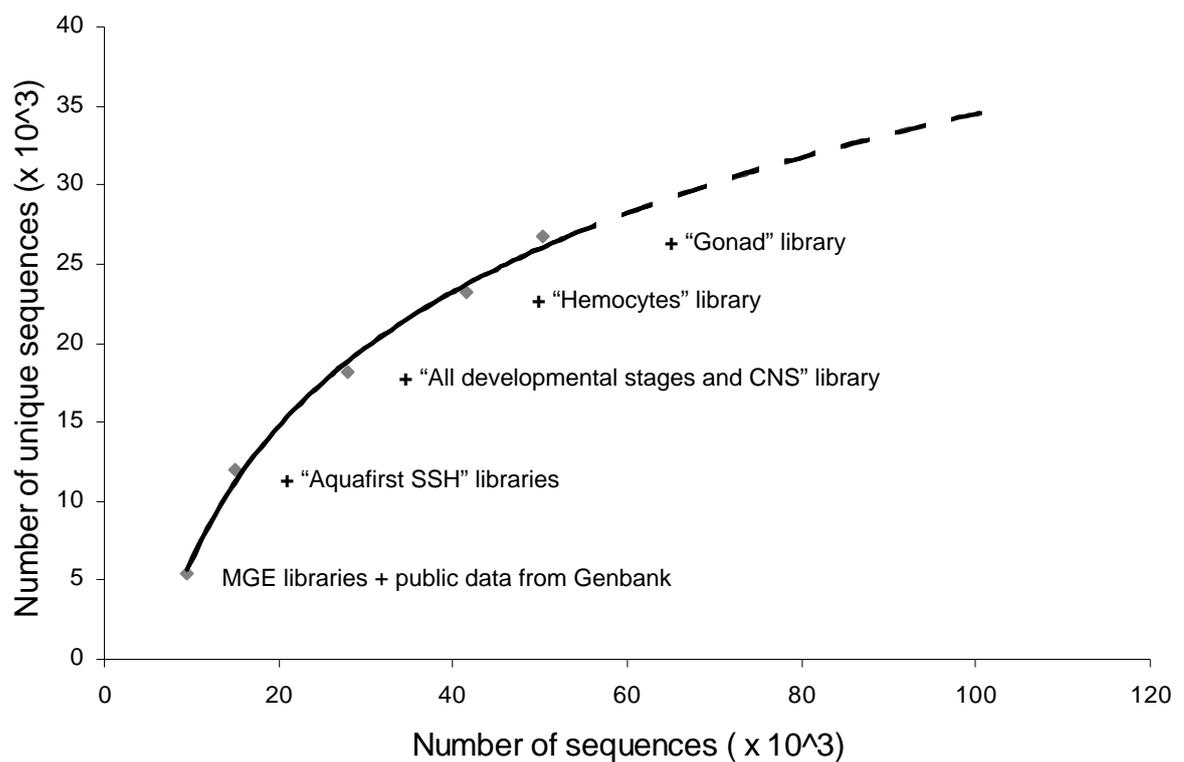


Figure 3: Distribution of E-values from the annotated ESTs available in the GigasDatabase. Hits represent the number of sequences.

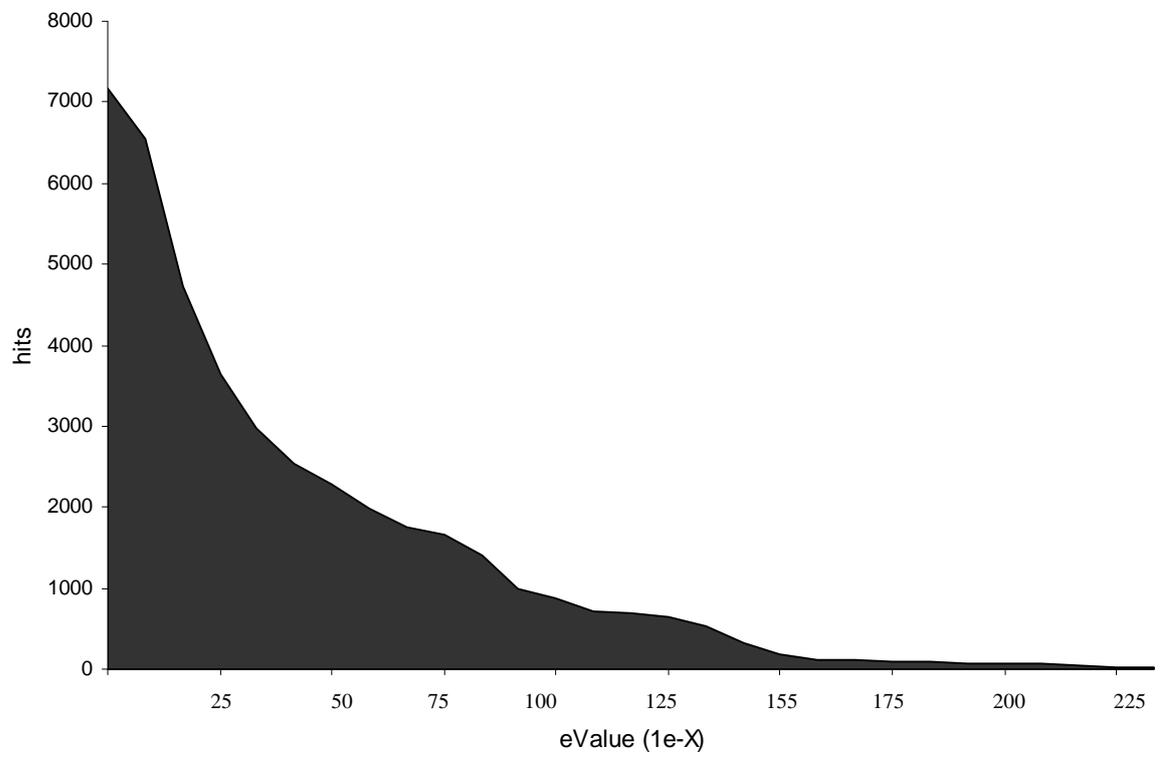


Figure 4: Species distribution. The proportion of putative transcripts with BlastX matches (E-value  $< 10^{-6}$ ) in the GigasDatabase classified according to the organism.

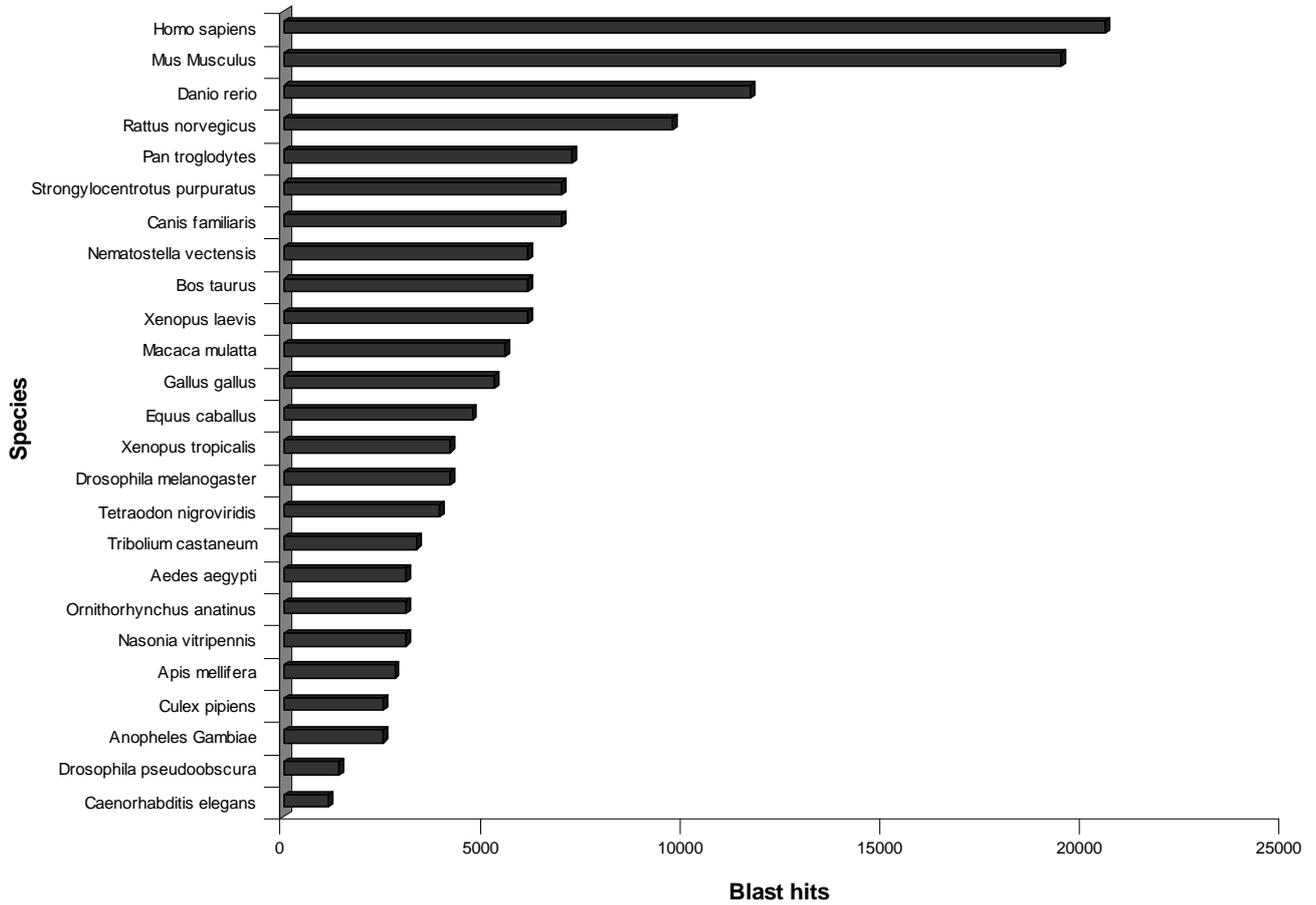


Figure 5: Identification of novel components of the TGFβ signaling pathway (in grey).

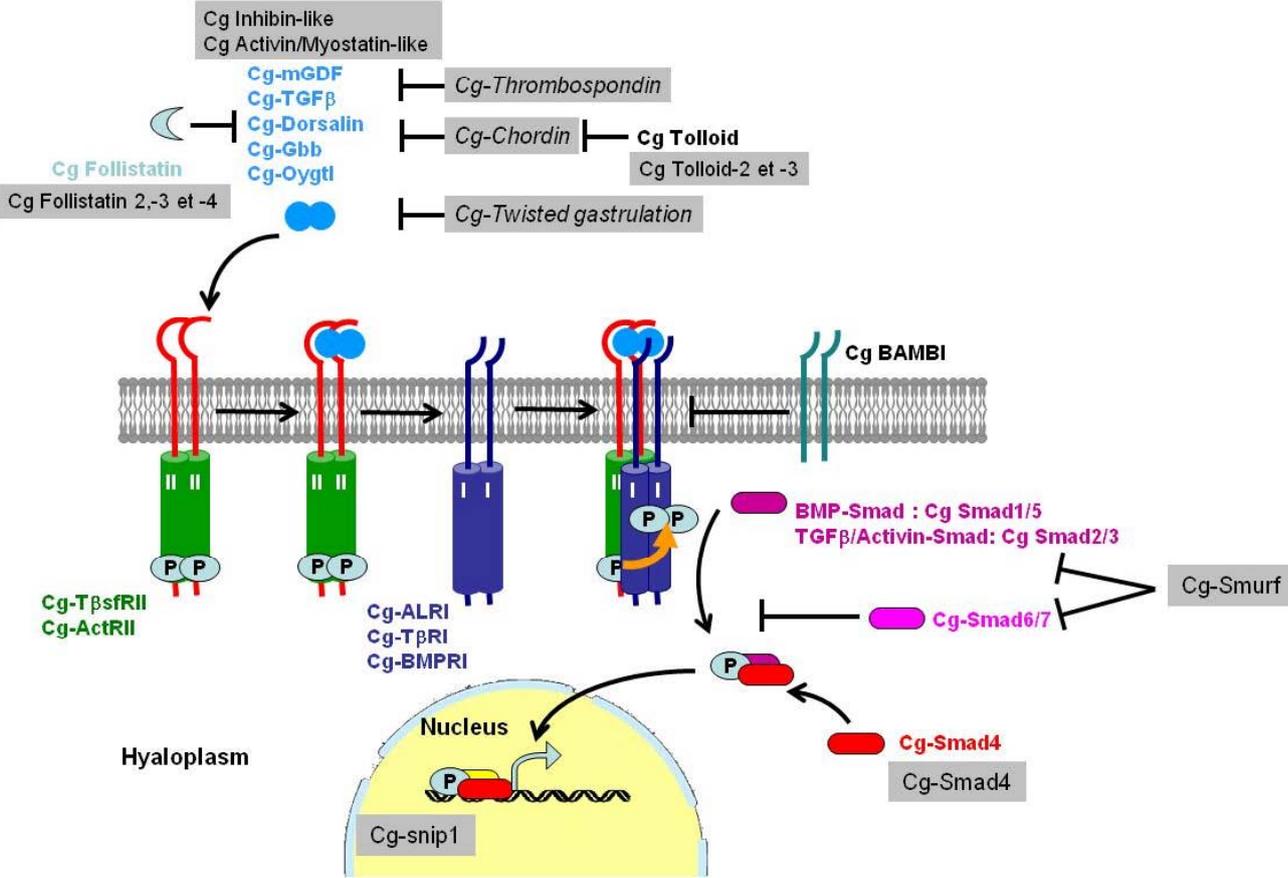
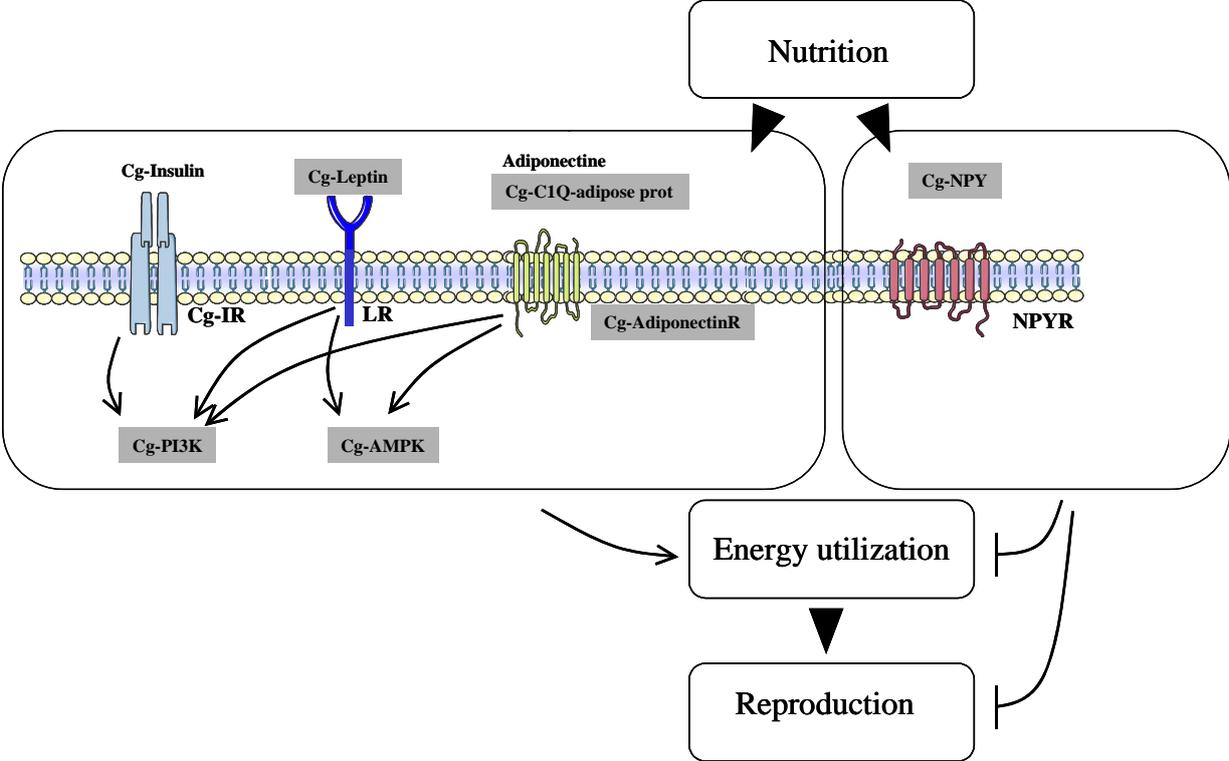


Figure 6: Identification of novel signaling molecules (in grey) linking energy utilization to reproduction.





---

**Deuxième chapitre :**  
**Comparaison transcriptomique**  
**des lignées Résistantes et**  
**Sensibles par puce à ADN**

---



# 1. Présentation générale et résumé de l'article

Dans le domaine de la génomique, un des objectifs principaux est d'utiliser les informations issues des efforts de séquençage pour avancer dans la compréhension des mécanismes biologiques associés au génome. En effet, l'enjeu réside à présent dans la caractérisation de la fonction des gènes et des voies de régulation des processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués. Ainsi, des outils et des stratégies innovants se sont développés en vue d'une exploration par des analyses fonctionnelles à l'échelle de la globalité des produits du génome. Pour cela, plusieurs techniques telles que le MPSS (Massive Parallel Signature Sequencing), le SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) ou encore les puces à ADN (*microarray*) se sont développées. Ces techniques prioritairement développées sur des organismes modèles tels que l'humain ou la souris, trouvent aujourd'hui plusieurs applications dans l'étude de la physiologie des animaux marins.

Les techniques MPSS et le SAGE offrent des avantages pour l'étude des organismes dont le génome est peu caractérisé car elles ne nécessitent pas d'information de séquences *a priori*, et génèrent un large échantillonnage d'étiquettes ou « *tags* », permettant l'identification de nouvelles séquences transcrites. Ces techniques permettent également de détecter et quantifier de façon relative des transcrits très faiblement représentés. Actuellement, 4.5 M de tags ont été identifiés chez différents génotypes de *C. gigas*, contenant 23274 signatures distinctes permettant de caractériser 350 gènes candidats pour l'étude de l'hétérosis de la croissance (Hedgecock *et al.*, 2007). Jusqu'à maintenant, il n'existe pas d'articles scientifiques relatant l'utilisation de l'approche SAGE chez les mollusques, mais des analyses faisant appel à cette technique sont en cours, afin d'étudier le transcriptome d'hémocytes soumis à des challenges infectieux (E. Bachère, com. pers.).

Les puces à ADN représentent un réseau de sondes ADN très dense déposées sur une surface solide. Cette technique permet de mesurer la quantité des ADN complémentaires à ces sondes en une seule hybridation. Les applications des puces à ADN sont multiples, puisqu'elles permettent de mesurer les variations du génome ou du transcriptome, de ré-séquencer un gène ou une région génomique, de déterminer les sites de fixation d'un facteur de transcription sur la chromatine ou bien de doser la présence d'un organisme pathogène dans les fluides biologiques (Baron *et al.*, 2007). L'application la plus courante de cette

technique, à savoir l'analyse du transcriptome, a été réalisée chez différents organismes. Ainsi, chez la truite, on dénombre plusieurs études faisant appel à des microarrays afin d'étudier, par exemple, les effets d'une ponte précoce sur la qualité des œufs (Bonnet *et al.*, 2007), l'effet du confinement sur l'expression de gènes du foie (Cairns *et al.*, 2008), ou encore la réponse des reins suite à des infections bactériennes (MacKenzie *et al.*, 2008). De même chez la moule, des analyses par microarray ont permis d'étudier les modifications d'expression de gènes associées à des pollutions côtières (Venier *et al.*, 2006). Chez l'huître, une première puce à ADN a été produite en 2007, contenant 4460 séquences de *C. virginica* et 2320 séquences de *C. gigas* (Jenny *et al.*, 2007) ; elle est actuellement utilisée pour estimer la réponse de l'huître *C. gigas* à des stress thermiques (Lang *et al.*, 2008).

C'est cette dernière technique de puce à ADN que nous avons choisi de mettre en place afin d'identifier les déterminants moléculaires des souches Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale. Ainsi, dans ce chapitre, nous détaillerons dans un premier temps le principe et le fonctionnement de ce type d'analyse, puis l'application que nous en avons faite au niveau de la comparaison transcriptomique des souches R et S.

## 1.1 Les approches transcriptomiques par puce à ADN

### 1.1.1 Définition et principaux types de puces à ADN

Le fonctionnement des puces à ADN repose sur le même principe d'hybridation d'une sonde à une séquence complémentaire que des technologies telles que le Southern blot ou le Northern blot, couramment utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe (Southern, 1975). La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « spots », chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles complémentaires aux sondes qu'il contient, en une seule expérience.

D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon, les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90. La miniaturisation, rendue possible par les progrès de la robotique, permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame. On distingue plusieurs types de puces selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes d'hybridation (Figure 37).

La méthode de fabrication des puces « spottées », que nous utiliserons ici, a été développée par l'équipe de P. Brown à l'Université de Stanford (DeRisi *et al.*, 1997). Des solutions d'ADN sont préparées soit par amplification PCR à partir du génome ou de banques d'ADN complémentaires, soit par synthèse d'oligonucléotides longs (30-70 mers). Des microgouttelettes de ces solutions sont ensuite déposées par un robot, selon une matrice d'emplacements définis, sur une lame de verre traitée par un revêtement chimique qui permet de fixer l'ADN.

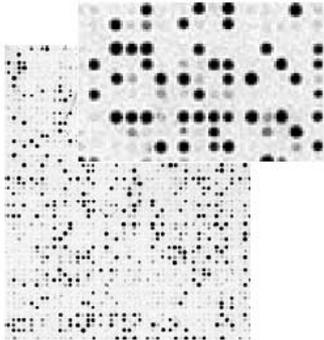
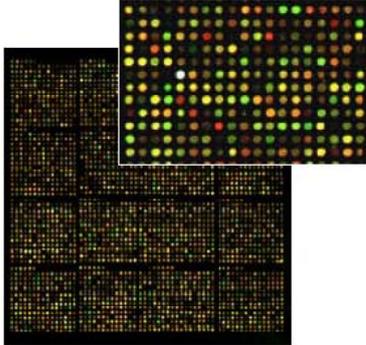
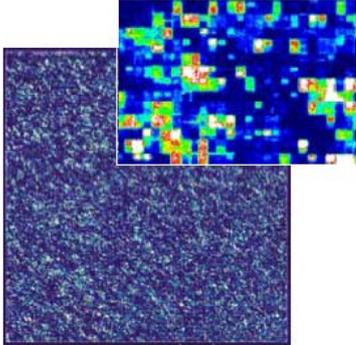
« Macroarray »	« Microarray spottée »	« GeneChips » de Affymetrix
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : membrane de nylon</li> <li>- taille des spots : 0,5-1mm</li> <li>- densité : quelques centaines de spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : produits de PCR</li> <li>- cibles : ADNc avec marquage radioactif au <sup>32</sup>P</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression des gènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : lame de verre à revêtement chimique</li> <li>- taille des spots : ~100µm</li> <li>- densité : 1000-10000 spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : produits de PCR ou oligonucléotides longs (30-70mers)</li> <li>- cibles : ADNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression, ChIP-on-Chip, CGH-array</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- support : lame de verre à revêtement chimique</li> <li>- taille des spots : ~20µm</li> <li>- densité : jusque 250000 spots/cm<sup>2</sup></li> <li>- sondes : oligonucléotides courts (20-25 mers) synthétisés <i>in situ</i></li> <li>- cibles : ARNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent à la biotine-streptavidine</li> <li>- principales applications : analyse de l'expression, détection de marqueurs moléculaires</li> </ul>

Figure 37 : Les principaux types de puce à ADN. D'après W. Lin, 2004.

### 1.1.2 Application à l'analyse de l'expression transcriptionnelle

L'analyse de l'expression transcriptionnelle des gènes (« *expression profiling* ») a été la première application pour laquelle la technologie des puces à ADN a été développée avec succès. L'hybridation d'un échantillon biologique sur une puce à ADN permet d'identifier et de mesurer l'abondance des espèces d'ARN messagers (ARNm) représenté sur le microarray qu'il contient. Dans la suite de l'étude, pour simplifier, le terme expression désignera, sauf indication contraire, l'expression transcriptionnelle, c'est-à-dire la production d'ARNm transcrits à partir de la matrice d'ADN d'un gène activé. L'utilisation des puces « spottées » permet d'acquérir une mesure relative du niveau d'expression des gènes dans un échantillon cellulaire/tissulaire par rapport à un témoin de référence, par exemple des lots sélectionnés comparés à des lots sauvages. Le principe expérimental est résumé dans la Figure 38.

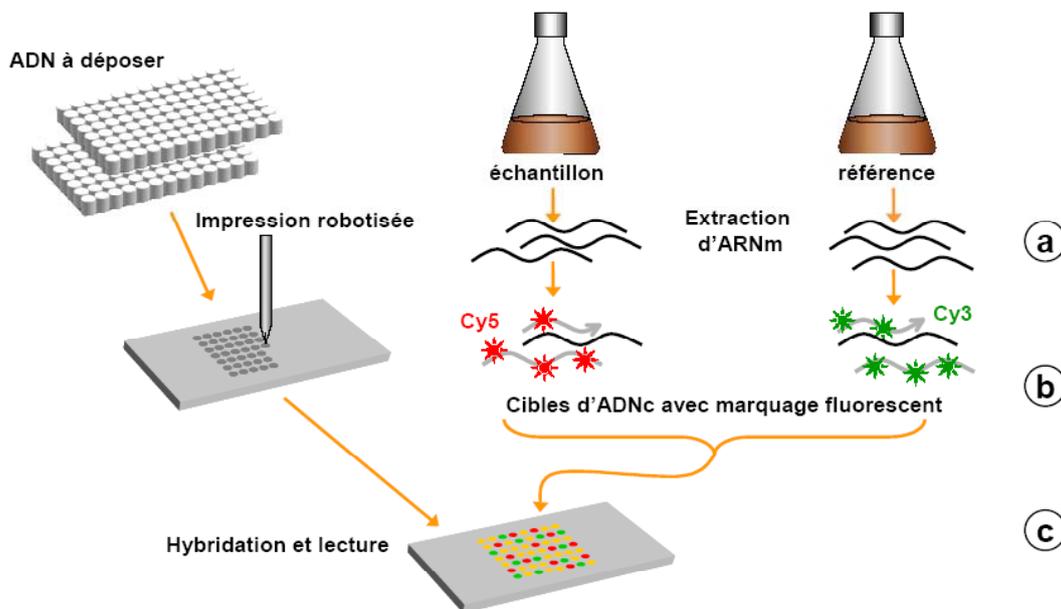


Figure 38 : Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur puce à ADN.

- Ensemble des ARNm extraits des prélèvements à analyser.
- Transcription reverse avec des nucléotides modifiés permettant de coupler un marqueur fluorescent : des cibles complémentaires (ADNc) représentatives de l'ensemble des gènes exprimés sont obtenues.
- Les échantillons marqués par des fluorochromes (Cy3 et Cy5) sont hybridés simultanément sur la même puce. Au contact de la puce, les brins d'ADNc marqués s'apparient avec les sondes de séquence complémentaire sur la lame. La mesure de l'intensité du signal fluorescent émis sur chaque spot permet de comparer le niveau d'expression relatif entre 2 échantillons.

Le transcriptome est la population des ARNm exprimés par un organisme à un instant donné. Il résulte d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation des ARNm et varie en fonction des conditions intra- et extra-cellulaires. Il offre ainsi une représentation dynamique de l'état de la cellule et des processus biologiques en cours. L'analyse du transcriptome permet d'établir le « profil d'expression » de chaque gène considéré, c'est-à-dire la variation de son niveau d'expression selon un ou plusieurs paramètres (temps, type cellulaire, souches...).

### 1.1.3 Les approches génomiques intégrées

Les analyses transcriptomiques sont de plus en plus liées aux analyses génétiques. En effet, il existe aujourd'hui des approches visant à coupler le génotypage SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et l'analyse du transcriptome. Par exemple, dans les approches de clonage positionnel, on détermine une région contenant plusieurs gènes candidats. L'analyse du transcriptome permet de déterminer les gènes exprimés dans le tissu atteint et dont l'expression diffère entre les individus normaux et les individus atteints. Ces gènes constituent ainsi de bons gènes candidats à analyser en priorité. Récemment, une approche originale appelée « génomique génétique » a été développée (Jansen *et al.*, 2001), visant à faciliter la découverte de gènes de susceptibilité dans les pathologies multifactorielles en couplant le génotypage SNP à l'analyse du transcriptome. L'idée principale est d'utiliser les expressions géniques comme des traits quantitatifs « expressed Quantitative Trait Loci » (eQTL). La recherche de polymorphismes génétiques affectant l'expression des gènes permet de relier les polymorphismes directement à l'expression des gènes. L'ensemble des gènes affectés par un même polymorphisme participe à une même fonction biologique, c'est-à-dire à un même trait quantitatif.

La « génomique génétique » est donc une approche qui combine les méthodes d'identification de loci associés à un trait quantitatif (QTL) à l'analyse microarray. Cette approche peut être utilisée pour identifier des associations entre des allèles d'une région génomique et la quantité d'ARN messager d'un gène. Il est donc possible d'utiliser à la fois les données de microarray et les marqueurs génétiques pour identifier les gènes dont la quantité d'ARNm est associée au trait quantitatif étudié en raison d'une liaison génétique avec le QTL sous-jacent (Baker, 2004).

En ce qui concerne nos recherches sur l'huître, nous avons développé, via le programme européen « Aquafirst », une large comparaison transcriptomique des souches Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale. Le but global de ce programme était d'identifier des déterminants moléculaires associés à la résistance au phénomène de mortalité estivale, et de fournir les bases physiologiques et génétiques du caractère « résistant » nécessaires à la mise en place de programmes de sélection assistée par marqueurs.

## 1.2 Application à la problématique des mortalités estivales

### 1.2.1 Le contexte général

Cette seconde partie présente l'identification, via l'analyse par puce à ADN, de marqueurs moléculaires associés à la résistance à la mortalité estivale. La comparaison transcriptomique des souches Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale permettra en effet d'examiner le(s) caractère(s) sélectionné(s) entre ces deux lignées génétiques.

La puce à ADN utilisée pour cette étude a été réalisée à partir d'une partie des séquences présentées dans le chapitre précédent. Le programme « Génoscope » ayant été mis en place après la production de la puce, les nouvelles séquences issues de ce projet n'ont pas été déposées sur la lame de verre. L'analyse présentée ci-après a donc été effectuée sur les 9058 ESTs spécifiques de *C. gigas* (produits de PCR spottés en duplicat sur la lame) issus des programmes Aquafirst, Marine Genomic Europe et des bases de données publiques (<http://www.sigenae.org/aquafirst/index.php?id=31>). Les recherches d'annotation (par BlastX dans la base de données SwissProt) ont révélé que 28% des séquences de clones déposés sur la lame sont annotées (e-Value < 1.e<sup>-5</sup>).

Dans le cadre du programme européen « Aquafirst », plusieurs expériences d'hybridation ont été réalisées, à partir de cette même puce à ADN, en conditions expérimentales ou en conditions *in situ*. Ces différentes expériences ont été choisies d'après le schéma d'interaction de plusieurs facteurs conduisant à la mortalité (*cf* Introduction). Ainsi, des comparaisons de réponses des huîtres R et S en conditions expérimentales de challenge bactérien (tissus branchies et manteau), en condition d'hypoxie (tissus branchies et muscle), ou en condition d'exposition à des sulfures (tissu glande digestive) sont actuellement en cours d'analyse par les autres équipes impliquées dans le projet (laboratoire ECOLAG de

Montpellier, le Plymouth Marine Laboratory de Plymouth, et le LEMAR de Brest). Les résultats présentés dans cette thèse, concernent les analyses réalisées sur des échantillons de gonades d’huîtres R et S prélevées *in situ* (Auray, Bretagne Sud) à différents temps précédant l’apparition des mortalités. Les caractères intrinsèques sélectionnés dans cette étude ont donc été réalisés dans des conditions identiques à celles utilisées pour les sélections divergentes permettant d’obtenir les lignées R et S (Dégremont *et al.*, 2005). L’étude du tissu «gonade» a été privilégié au regard de l’importance que la reproduction semble avoir dans l’interaction menant à la mortalité estivale (*cf.* Introduction). A terme, ces résultats pourront être comparés aux résultats associés aux analyses expérimentales réalisées sur des tissus communs (via des méta-analyses), afin d’estimer le poids respectif de ces facteurs dans l’apparition de ce phénomène.

### 1.2.1 Les résultats de l’expérience « *in situ* »

Dans le cadre de notre étude, la puce à ADN a été hybridée avec des pools d’échantillons extraits de gonades d’huîtres R et S, prélevés pendant la phase de gamétogenèse active, la mortalité cumulée étant de 22% et 56% respectivement pour les huîtres R et S. Au final, 4 dates (Figure 39) ont été utilisées pour les analyses, avec 3 réplicats « R » et « S » pour chaque date. Le choix des dates utilisées pour l’analyse s’est fait *a posteriori*, et se situent avant l’apparition du pic de mortalité.

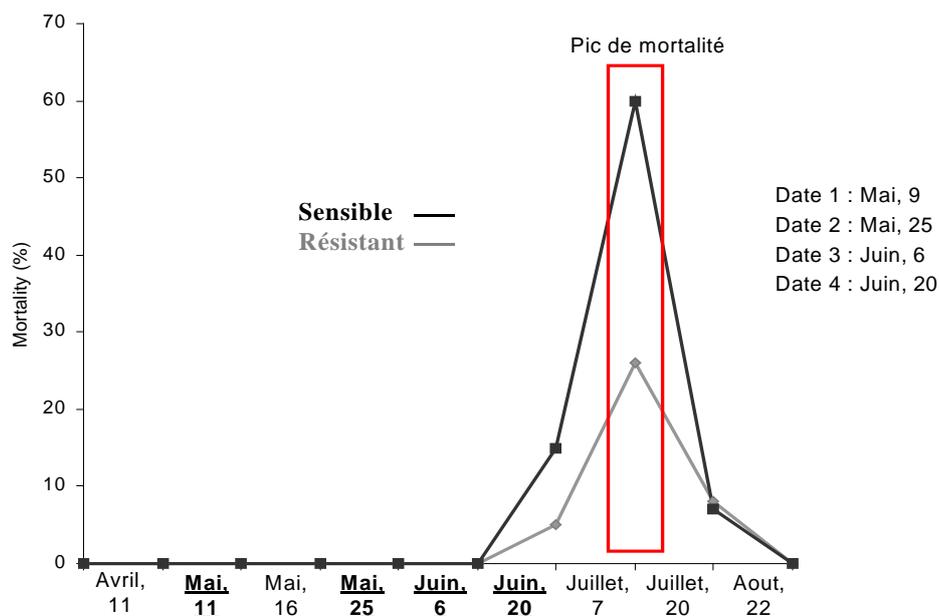


Figure 39 : Taux de mortalité obtenus pour les huîtres Résistantes et Sensibles prélevées au cours de l’expérience « *in situ* ». Les dates des prélèvements utilisés pour les analyses par puce à ADN sont en gras.

Les premières analyses de vérification de la qualité et de la reproductibilité des données d'hybridation ont été satisfaisantes. En effet, les différents filtres imposés afin d'éliminer les spots de «mauvaise qualité» n'ont éliminé que 1% des clones spottés. De plus, les coefficients de corrélation obtenus pour les valeurs de microarray entre répliquats techniques ou entre répliquats biologiques sont toujours supérieurs à 0.90 (Figure 40). Enfin, les comparaisons de valeurs obtenues pour plusieurs ESTs présents sur la lame codant pour le même gène (*i.e.* Calmodulin, Myosin, Ubiquitin) ont également montré des taux de corrélation très élevés (de l'ordre de 0.9 pour chaque gène testé).

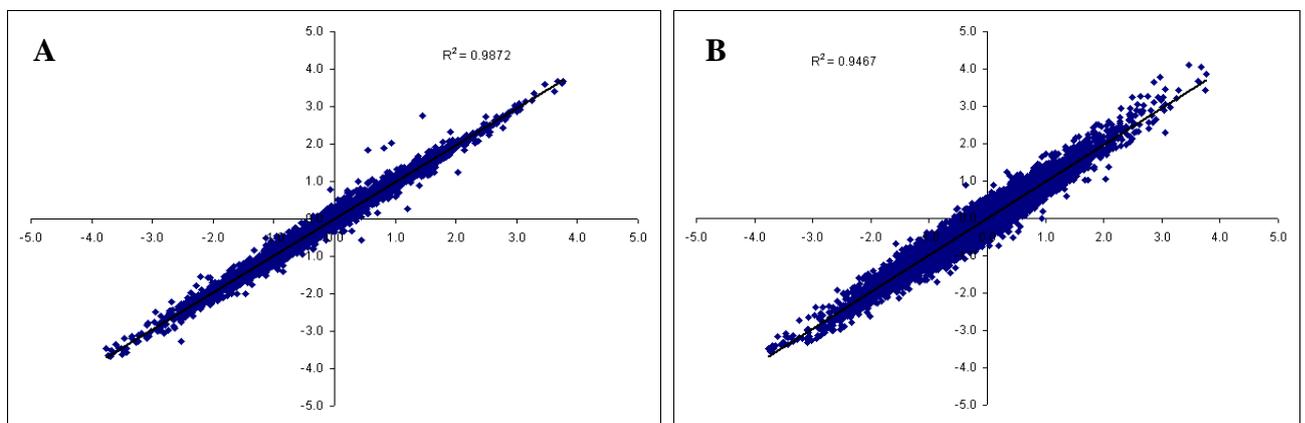


Figure 40 : Exemples de scatterplot de valeurs de microarrays obtenues pour deux répliquats techniques (A) et deux répliquats biologiques (B).

Afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre les lignées R et S, des analyses statistiques par ANOVA ont été réalisées. L'étude a permis l'identification de 34 ESTs dont les variations d'expression au cours des 4 dates analysées ne sont dues qu'au facteur « lignée » (Résistantes ou Sensibles). Ces ESTs ont été sélectionnées selon un critère de  $p\text{-value} < 1.e^{-4}$ , ce qui correspond à un FDR (False Discovery Rate) de 2.6%. Ces candidats se répartissent selon deux clusters distincts : 17 ESTs sur-exprimées chez R par rapport à S pour l'ensemble des 4 dates, et 17 ESTs sous-exprimées chez R par rapport à S sur ces mêmes dates (Figure 41).

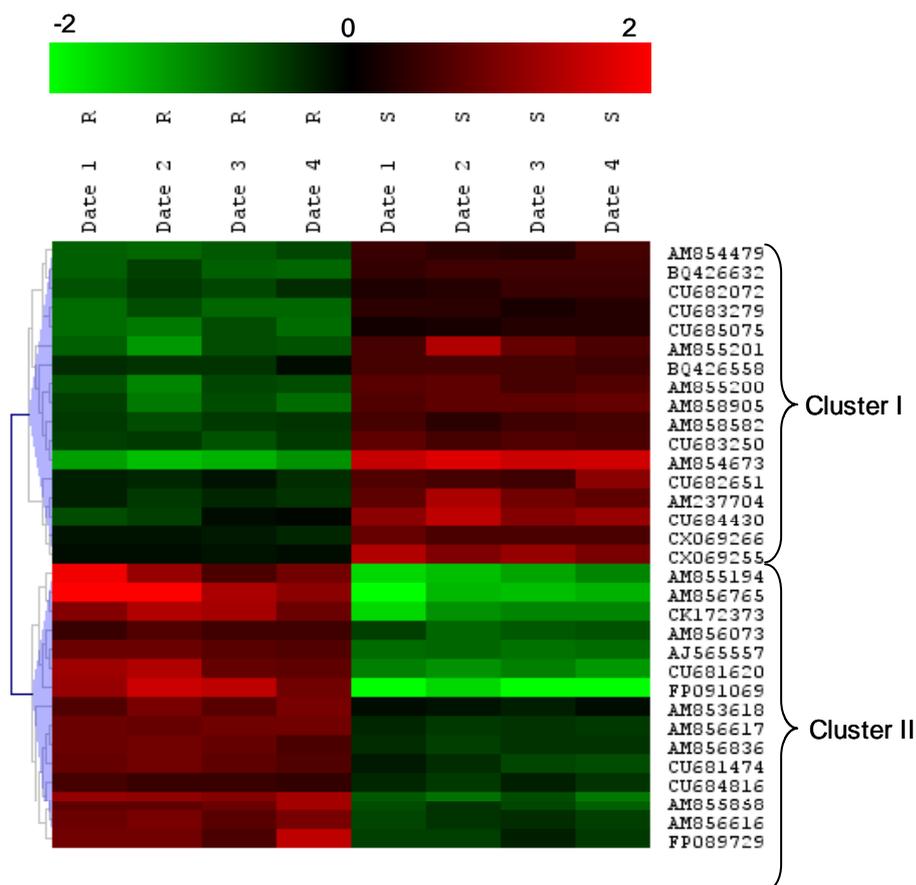


Figure 41 : Clustering hiérarchique des 34 ESTs différemment exprimées entre R et S pour les 4 dates analysées. Les cluster I contient les ESTs sous exprimées chez R par rapport à S, et le cluster II contient les ESTs sur-exprimées chez R par rapport à S.

Les études d'annotation réalisées sur ces 34 candidats ont montré que 16 d'entre eux présentent des annotations fonctionnelles (Tableau 3). Sur la base de ces annotations et/ou du différentiel observé entre les lignées R et S, nous en avons sélectionné 9 qui ont fait l'objet d'une validation par PCR en temps réel. La comparaison des ratios R/S obtenus pour les mêmes échantillons par microarray ou par PCR en temps réel a montré une très bonne corrélation ( $R^2 = 0.9$ ) entre ces deux techniques, confirmant ainsi la fiabilité des résultats.

Genbank #	Signae name	Swissprot hit description	E-value	Cluster
FP089729	oyih10b03k06r1_m13r.1.a.cg.1	Succinate dehydrogenase	2E-62	
AM855200	cdn20p0002o22.f.1.a.cg.1	NA		
AM855201	cdn20p0002o24.f.1.a.cg.1	NA		
AM858582	cdn37p0004k03.f.1.a.cg.1	NA		
AM858905	cdn37p0005i17.f.1.a.cg.1	NA		
AM854479	cdn19p0004j23.f.1.a.cg.1	NA		
BQ426558	BQ426558.1.a.cg.1	NA		
BQ426632	BQ426632.1.a.cg.1	NA		
AM237704	AM237704.1.a.cg.1	NA		Cluster I
CU682072	oygd09b08j20r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
CU683250	oyge09b11e21r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
CU683279	oyge09b11e22r1_m13rev.1.a.cg.1	Tetratricopeptide repeat protein 28	2E-25	
CU684430	oyge10b14l11r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
CU685075	oypg10b07l21r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
<b>AM854673</b>	<b>cdn20p0001d16.f.1.a.cg.1</b>	<b>Heat shock 70 kDa protein</b>	<b>5E-24</b>	
CU682651	oygd10b10m11r1_m13rev.1.a.cg.1	Mammalian ependymin-related protein	2E-9	
<b>CB617381</b>	<b>CB617381.1.a.cg.1</b>	<b>CD109 antigen precursor</b>	<b>7E-12</b>	
AM853618	cdn19p0002c05.f.1.a.cg.1	Catalase	2E-83	
<b>AM855194</b>	<b>cdn20p0002o15.f.1.a.cg.1</b>	<b>acylcarnitine carrier protein</b>	<b>1E-35</b>	
AM855858	cdn20p0005g01.f.1.a.cg.1	NA		
AM856073	cdn21p0001b19.f.1.a.cg.1	NA		
<b>AM856249</b>	<b>cdn21p0001j08.f.1.a.cg.1</b>	<b>Neuropeptide Y receptor</b>	<b>5E-6</b>	
AM856616	cdn21p0002j12.f.1.a.cg.1	Scavenger receptor	9E-8	
AM856617	cdn21p0002j13.f.1.a.cg.1	MAP kinase-activated protein	1E-77	
<b>AM856765</b>	<b>cdn21p0003a17.f.1.a.cg.1</b>	<b>Oyster-gonadal-TGFb-like</b>	<b>0</b>	
AM856836	cdn21p0003d20.f.1.a.cg.1	WD repeat-containing protein 92	6E-117	Cluster II
CU684816	oypg09b05m11r1_m13rev.1.a.cg.1	Hexokinase type I	7E-9	
CU681474	oygd09b07d18r1_m13rev.1.a.cg.1	<b>Cytochrome c oxidase</b>	<b>2E-53</b>	
<b>CK172373</b>	<b>CK172373.1.a.cg.1</b>	<b>NA</b>		
AJ565557	AJ565557.1.a.cg.1	NA		
<b>CU681620</b>	<b>oygd09b07c21r1_m13rev.1.a.cg.1</b>	<b>Superoxide dismutase</b>	<b>2E-62</b>	
<b>FP091069</b>	<b>oyio10b01h21r1_m13r.1.a.cg.1</b>	<b>Dopamine receptor</b>	<b>4E-24</b>	
CX069266	oygd10b09a22r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
CX069255	CX069255.1.a.cg.1	NA		

Tableau 3 : Liste des ESTs différentiellement exprimées entre les gonades des lignées Résistantes et Sensibles, identifiées par analyse microarray. Les gènes étudiés par PCR en temps réel apparaissent en gras. Les meilleurs résultats des analyses de Blast X dans la banque SwissProt sont présentés, avec la e -Value correspondante. Le cluster I regroupe les ESTs sous exprimées chez R par rapport à S, le cluster II regroupe les ESTs sur-exprimées chez R par rapport à S.

Afin d'aller plus loin dans l'étude de l'impact de la composante génétique sur le différentiel d'expression observé pour ces 9 gènes, nous avons mesuré leurs niveaux d'expression pour des échantillons R et S prélevés juste avant l'apparition des mortalités, mais dans des conditions différentes de génération, d'environnement et d'âge (Tableau 4). Cette analyse, qui s'intéresse au caractère « systématique » du différentiel d'expression observé, permet ainsi de hiérarchiser l'intérêt des candidats sélectionnés.

	Age	Génération	Environnement	Taux de mortalité
<b><u>Condition 1</u></b>	4 mois	G2	nurserie (Bouin)	S : 74% R : 4%
<b><u>Condition 2</u></b>	4 mois	G3	nurserie (Bouin)	S : 80% R : 30%
<b>Condition 3</b>	16 mois	G2	Bretagne sud	S : 14% R : 5%
<b>Condition 4</b>	16 mois	G2	Normandie	S : 8% R : 5%

Tableau 4 : Les différentes conditions testées sur les 9 gènes sélectionnés par microarray. Les conditions soulignées correspondent aux conditions pour lesquelles des mortalités significatives ont été observées.

Les résultats (Figure 42) indiquent que certains candidats apparaissent systématiquement différentiellement exprimés entre R et S, quelle que soit la condition testée : c'est le cas des ESTs annotées en tant que dopamine receptor, neuropeptide Y receptor et d'un candidat ne possédant pas d'annotation (CK172373). Il est également intéressant de noter que certains candidats, annotés en tant que CD109 antigen precursor, oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like, acylcarnitine carrier protein et superoxide dismutase ne sont différentiellement exprimés que dans les conditions pour lesquelles des taux de mortalités significatifs (*i.e.* > 15%) sont observés (conditions 1 et 2). Enfin, les candidats Heat shock protein 70 et cytochrome c oxidase n'étant différentiellement exprimés entre R et S que pour une des conditions testées apparaissent moins pertinents.

Ainsi, les candidats systématiquement différentiellement exprimés entre R et S lorsque des mortalités significatives sont observées constituent des candidats d'intérêt pour les analyses de QTLs. En effet, les études de QTLs visent à cibler une région du génome affectant un trait de caractère particulier, et dans notre cas, le trait associé à la résistance à la mortalité estivale. L'identification de ces QTLs permettra de mieux comprendre cette résistance, et d'envisager des programmes de sélection assistée par marqueur.

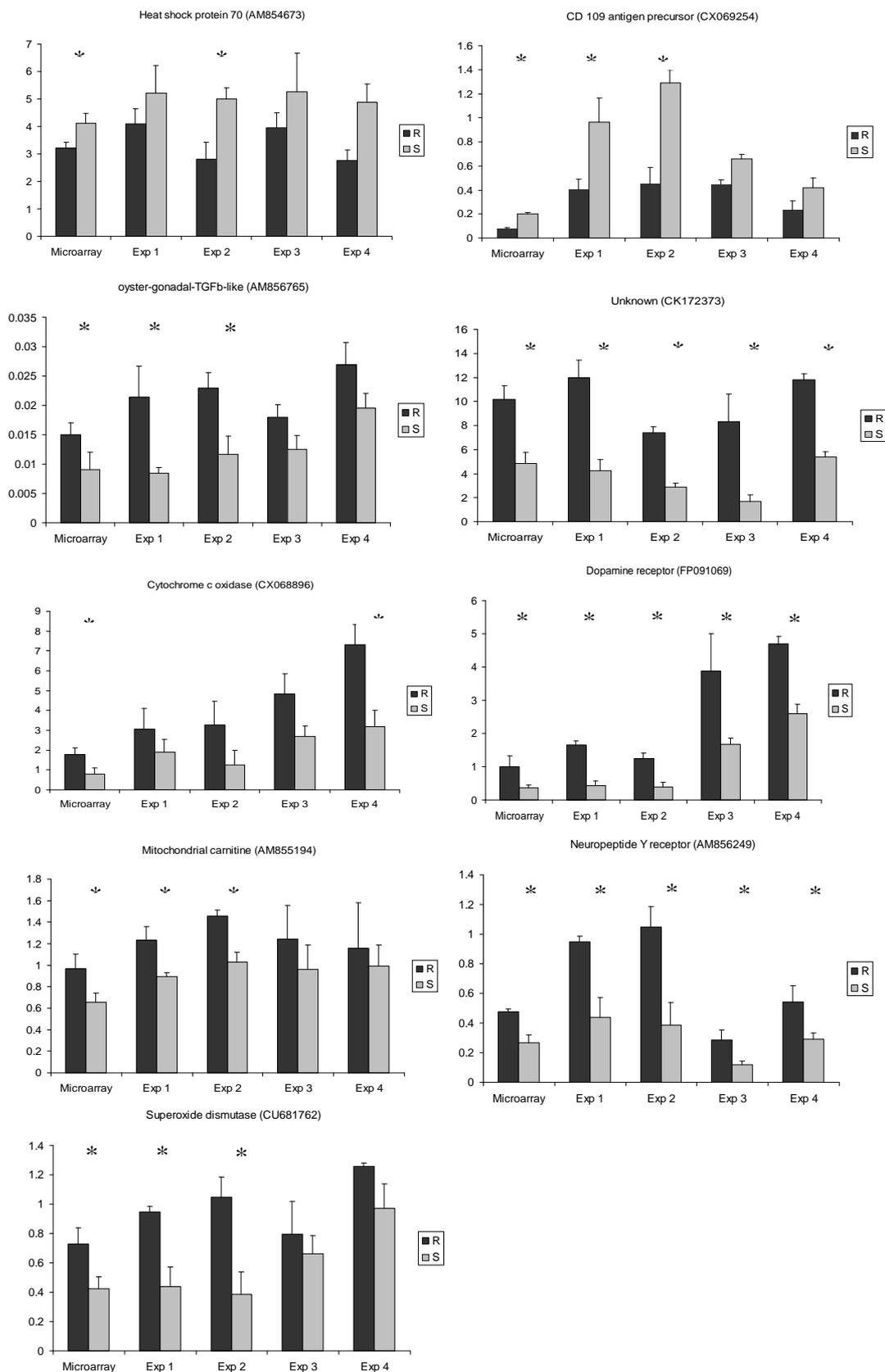


Figure 42 : Niveaux d'ARNm estimés par PCR en temps réel des 9 gènes sélectionnés entre des gonades d'huîtres R et S prélevées pour les microarrays et pour 4 autres expérimentations, faisant varier l'âge, la génération et l'environnement (cf Tableau 4).

Les différents gènes identifiés au cours de ces analyses constituent également des candidats à privilégier pour de futures analyses fonctionnelles. En effet, ces candidats, d'après leurs annotations, semblent associés à des processus biologiques dont l'implication dans les mortalités estivales avait déjà été suspectée. On citera pour exemple l'identification d'une EST annotée en tant que « Neuropeptide Y receptor » qui semble impliquée dans le contrôle de la balance énergétique et la reproduction, en réduisant l'investissement dans la reproduction lorsque les réserves énergétiques sont déficientes (Schneider, 2004). D'autres marqueurs identifiés ont attiré également au stress oxydatif, avec l'identification d'ESTs annotées en tant que catalase et superoxide dismutase (Jo *et al.*, 2008), comme étant sur-exprimés chez R par rapport à S. Compte tenu du peu de marqueurs du stress oxydatif présents sur la lame (4 en tout), nous pouvons considérer que l'identification de ces deux marqueurs par nos analyses rend très probante l'implication du stress oxydatif comme processus physiologique altéré lors des mortalités estivales.

Ces analyses ont permis l'identification d'un candidat annoté « oyster-gonadal-Transforming-Growth-Factor $\beta$  », dont une étude approfondie a été réalisée (voir chapitre suivant), afin d'avancer dans la compréhension d'une part, de son fonctionnement au sein de l'huître, et d'autre part, de son rôle potentiel dans les mortalités estivales.

Pour terminer, très récemment, une analyse par ANOVA a été réalisée selon chacune des 4 dates, prise en compte séparément, afin d'identifier de façon ponctuelle quels étaient les gènes différentiellement exprimés entre R et S (non détaillée dans l'article). Les résultats de cette analyse à la date 4, c'est-à-dire la date précédant l'apparition des mortalités, ont mis en évidence un résultat très intéressant. En effet, l'analyse statistique a permis d'identifier 61 ESTs significativement différentiellement exprimées entre les lignées R et S, selon un FDR < 5%. Parmi celles-ci, 36 ESTs (soit 59% des ESTs identifiées) possèdent une annotation potentiellement reliée à l'immunité (Tableau 5). Cette observation ouvre donc de nouvelles perspectives quant à l'interprétation des processus affectés lors des mortalités estivales, ces gènes liés à l'immunité ayant été identifiés uniquement à la dernière date précédant les mortalités. En effet, d'autres analyses seront nécessaires, notamment avec l'équipe spécialisée en immunologie (V. Boulo, laboratoire ECOLAG, Ifremer Montpellier), afin de déterminer les éventuels processus immunitaires impliqués. L'analyse approfondie de ces résultats permettra également de mettre en évidence une éventuelle défaillance des défenses immunitaires des huîtres S par rapport aux huîtres R.

Genbank #	Sigane Name	Swissprot hit description	E-value
AM853211	cdn19p0001a09.f.1	Calcitonin receptor precursor	1.00E-29
AM853394	cdn19p0001i09.f.1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.00000001
AM853409	cdn19p0001i24.f.1	Complement regulatory protein Crry precursor	0.000002
AM853504	cdn19p0001n04.f.1	NF-kappa-B inhibitor cactus	3.00E-33
AM853576	cdn19p0002a07.f.1	Neurogenic locus notch protein 2 precursor	3.00E-14
AM853699	cdn19p0002f20.f.1	Ankyrin repeat protein	1.00E-12
AM853924	cdn19p0002p24.f.1	Ras-like GTP-binding protein	2.00E-37
AM854099	cdn19p0003h24.f.1	Tubulin alpha-1 chain	1.00E-174
AM854377	cdn19p0004f01.f.1	Mitoferrin-1	3.00E-48
AM854490	cdn19p0004k12.f.1	Neurogenic locus Notch protein precursor	0.0000002
AM854660	cdn20p0001d03.f.1	Kinesin-like protein	8.00E-10
AM854726	cdn20p0001f21.f.1	Toll-like receptor 4 precursor	3.00E-21
AM855543	cdn20p0004d22.f.1	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit	4.00E-94
AM856093	cdn21p0001c15.f.1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2.00E-60
AM856242	cdn21p0001j01.f.1	Fucoatlectin-7 precursor	0.0000007
AM856743	cdn21p0002p18.f.1	NF-kappa-B inhibitor cactus	5.00E-29
AM856775	cdn21p0003b03.f.1	Prostaglandin E2 receptor	3.00E-23
AM856921	cdn21p0003h18.f.1	Set1/Ash2 histone methyltransferase	3.00E-60
AM856953	cdn21p0003j05.f.1	Leukocyte common antigen precursor	0.00000001
AM857213	cdn21p0004f05.f.1	Mitogen-activated protein kinase	1.00E-95
AM857298	cdn21p0004j22.f.1	Prostaglandin E2 receptor	3.00E-21
AM857760	cdn37p0002c03.f.1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	7.00E-60
AM858229	cdn37p0003j12.f.1	Protein NLRC3	6.00E-13
AM858329	cdn37p0003o10.f.1	Homeobox protein	2.00E-39
AM859022	cdn37p0005n23.f.1	Mitogen-activated protein kinase	1.00E-24
CU681745	oygd09b07i13r1_m13rev.1	B-cell lymphoma	8.00E-12
CU681715	oygd09b07k07r1_m13rev.1	Integrin beta-PS precursor	1.00E-17
CU683323	oyge09b11i11r1_m13rev.1	Chitotriosidase-1 precursor	9.00E-55
CU683194	oyge09b11m02r1_m13rev.1	Ras-like GTP-binding protein	8.00E-94
CU683707	oyge09b12m06r1_m13rev.1	Toll-like receptor 1 precursor	0.000004
CU683708	oyge09b12m14r1_m13rev.1	Neurogenic locus notch homolog protein 2	2.00E-13
CU684879	oypg09b05h19r1_m13rev.1	Ras-like GTP-binding protein	8.00E-94
CU685072	oypg10b07d22r1_m13rev.1	Ankyrin repeat protein	0.000002
CU685188	oypg10b07f04r1_m13rev.1	Complement component C1q receptor precursor	7.00E-15
CU685152	oypg10b07j13r1_m13rev.1	Ankyrin repeat protein	2.00E-22
CU686145	oypm10b03f16r1_m13rev.1	Suppressor of cytokine signaling	4.00E-18

Tableau 5 : Liste des 36 ESTs différenciellement exprimées entre les gonades des lignées Résistantes et Sensibles, identifiées par ANOVA à la date 4, et potentiellement associées à l'immunité. Les meilleurs résultats des analyses de Blast X dans la banque SwissProt sont présentés, avec la e -Value correspondante.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre, excepté les résultats associés à l'analyse par ANOVA réalisée à la date 4, a fait l'objet d'une publication scientifique présentée ci-après, qui sera prochainement soumise au journal « Genomics ».

## 2. Article n°2

**Microarray based identification of new genes differentially expressed between lines selected to be resistant or sensitive to summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas***

**Short title :** Genes associated with summer mortality of oyster.

### **Authors' names:**

Elodie Fleury <sup>a</sup>, Jeanne Moal <sup>a</sup>, Viviane Boulo <sup>b</sup>, Jean-Yves Daniel <sup>a</sup>, David Mazurais <sup>c</sup> Alain Hénaut <sup>d</sup>, Charlotte Corporeau <sup>a</sup>, Pierre Boudry <sup>a</sup>, Pascal Favrel <sup>a</sup>, Arnaud Huvet <sup>a\*</sup>

### **Addresses:**

<sup>a</sup> UMR M100 Ifremer- Université de Caen Basse Normandie “Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins”, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané / IBFA, IFR ICORE 146, Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex, France.

<sup>b</sup> Ifremer, CNRS Université de Montpellier 2, UMR 5119 ECOLAG CC 80, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France.

<sup>c</sup> Ifremer, UMR 1067 Nutrition, aquaculture, et génomique, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France.

<sup>d</sup> CNRS Université Pierre et Marie Curie, UMR 7138 Systématique, adaptation, évolution, Case 05, 75252 Paris Cedex, France.

### **\* Corresponding author:**

A. Huvet, Unité Mixte de Recherche M100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins,

Ifremer, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France. Phone: +33 (0)2 98 22 46 93

Fax: +33 (0)2 98 22 46 53 - Email: [ahuvet@ifremer.fr](mailto:ahuvet@ifremer.fr).

### **Keywords:**

Bivalve mollusc, gene expression, summer mortality, cDNA microarray, reproductive investment, oxidative metabolism.

## ABSTRACT

Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is the result of a complex interaction between oysters, their environment, and pathogens. Heritable character appears to be a major determinant in the sensitivity of oysters to summer mortality, as demonstrated by a divergent selection experiment that allowed developing resistant (R) and Sensitive (S) lines. We report here the study of these lines through functional genomics, with the aim to identify differentially expressed genes that may represent key molecular factors for resistance to summer mortality. We conducted a genome-wide expression profiling of R and S gonads during a 3-month period preceding summer mortality event using a novel cDNA microarray containing 9,058 unigenes. ANOVA analysis revealed that 34 genes were differentially expressed between R and S lines for four dates preceding the mortality event. Most of these genes are associated with biological processes previously suspected to be involved in the mortality phenomena, including response to stress (*e.g. catalase, superoxide dismutase, dopamine*), energy metabolism (*e.g. acylcarnitine carrier protein, Neuropeptide Y receptor*), and reproduction (*e.g. oyster-gonadal-Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -like*). This transcriptional analysis provides new clues for Quantitative Trait Loci search and for defining novel candidate genes for functional studies to unravel their function and to identify their role in the mortality phenomena.

## INTRODUCTION

Significant mortality of the Pacific oyster has been reported to occur during the summer months in several countries and is a major concern of oyster farmers (Samain & McCombie, 2008). Studies performed within the framework of the multidisciplinary project “Morest” suggested that summer mortality in *Crassostrea gigas* is caused by complex interactions between oysters, their environment and pathogens (Samain *et al.*, 2007). A large genetic basis was shown to exist for the observed variation in resistance to summer mortality, as 45% of the variance in mortality in the field was observed between families (Dégremont *et al.*, 2005). A high heritability was also estimated for this trait (Dégremont *et al.*, 2007). This has opened up possibilities to develop inbred and outbred lines of oysters ‘Resistant’ (R) or ‘Sensitive’ (S) to summer mortality (Boudry *et al.*, 2008).

The physiological status of the oyster is suspected to play a role in the resistance to mortality. The reproduction, the energy metabolism and stress defenses are likely to be the main components of this status (Samain & McCombie, 2008). Due to the high reproductive allocation in oysters, gametogenesis is a period of negative energy budget in summer when most of the acquired energy is used for the production of gametes (Soletchnik *et al.*, 1997; Berthelin *et al.*, 2000). Interestingly, R and S oysters showed a differential investment for reproduction with R families displaying lower reproductive effort than S families (Samain *et al.*, 2007). This supports the positive genetic correlations between reproductive effort plasticity and survival reported by Ernande *et al.* (2004). These results, together with the better survival of triploid oysters (Boudry *et al.*, 2008) suggest that R lines may better survive because they are not as reproductively active as S lines (Samain & McCombie, 2008). Moreover, previous studies showed that carbohydrate energy fluxes and their management differ between R and S lines (Samain *et al.*, 2007), suggesting that R oysters would have an increased potential for energy production compared to S oysters. Consequently, whereas more energy is needed for reproduction in S lines, the energy budget is therefore in favor to R oysters, meaning that more energy is thus available for the maintenance compartment in R lines (Samain & McCombie, 2008). Impacts in terms of capacity for defense against pathogenic agents (e.g. *Vibrio sp.*, ostreid Herpes Virus type 1 OsHV-1) present in the environment and to stressful environmental modifications (hypoxia, pollutants ...) are thus to be taken into consideration in the differential survival observed between R and S.

To further investigate the selected character between R and S genetic lines, the present study aimed to identify differentially expressed genes between the two lines in order to obtain

molecular markers of the resistance to summer mortality, using a genome-wide expression profiling with cDNA microarray. To date, a single cDNA microarray containing 4,460 sequences derived from *C. virginica* and 2,320 from *C. gigas* has been produced (Jenny *et al.*, 2007) and used to study the response of selected families of *C. gigas* to heat stress challenge (Lang *et al.*, 2008). In the present study, through the framework of the Network of Excellence ‘Marine Genomics Europe’ (<http://www.marine-genomics-europe.org/>) and the EU funded project ‘Aquafirst’ (<http://www.siginae.org/aquafirst/>), a much larger cDNA microarray containing 9,058 unigenes of *C. gigas* was produced and used to conduct the genome-wide expression profiling of gonads of R and S lines for four dates preceding a summer mortality event. Statistical analyses allowed to point out 34 genes differentially expressed between R and S lines. Candidate genes have also been prioritized from the literature based on known biological processes previously suspected to be involved in the mortality phenomena and for their consistent differences between R and S lines in various conditions. Indeed, these candidates were studied by real-time PCR on different R and S gonad oysters sampled just before a mortality event, and in different conditions of age, generation and environment to focus on the genetic component underlying their phenotypic differences. According to the obtained results, we discuss the interest of these candidate genes to understand the factors that may contribute to the genetic susceptibility of the sensitive oysters.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *1. Animals sampling*

Following a divergent selection experiment on spat survival, a fourth generation of Resistant (R) and Sensitive (S) lines was produced in March 2004 in the Ifremer hatchery in La Tremblade (France). Intra-line crosses of “G3c2” generated the inbred “G4R” and “G4S” batching according to the crossing designs fully detailed in Boudry *et al.* (2008). An average of 10 males and 16 females were used for each parental group and crosses were made in both possible directions (males x females and females x males). 500 oysters per G4R and G4S batch were kept at the Bouin nursery (France) away from mortality risks. They were then deployed in the field at Fort Espagnol (South Brittany, France) in March 2005, when they were 12 month-old. Oysters were cultured using the local practice in bags fixed on racks. To monitor mortality, oysters were counted the 11<sup>th</sup> of April, the 9<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 25<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup> of May, the

6<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> of June, the 7<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> of July and finally the 22<sup>nd</sup> of August. Dead oysters were removed from the bags, and the remaining oysters were reared in the same conditions.

For microarray analysis, R and S oysters were sampled five times (dates 1 to 5: May 9<sup>th</sup>, May 25<sup>th</sup>, June 6<sup>th</sup>, June 20<sup>th</sup> and July 20<sup>th</sup> respectively; Figure 1). At each sampling date and for each line (R and S), 3 replicates of 8 oysters were used for gonad dissection and prepared for total RNA extraction. Furthermore, all tissues of 10 wild oysters were collected and mixed to constitute a unique total RNA sample, used as reference for all the slide hybridizations and for real-time PCR analysis.

Four other experiments of R and S oyster lines were already available (Fleury *et al.*, 2008), corresponding to (1) spat oysters, 4 month-old, generation 2, nursery (G2R and G2S); (2) spat oysters, 4 month-old, generation 3, nursery (G3R and G3S); (3) adult oysters, 16 month-old, generation 2, South Brittany field (G2 RA R and G2 RA S); (4) adult oysters, 16 month-old, generation 2, Normandy field (G2 BDV R and G2 BDV S). For each experiment, the mortality peak was observed after the sampling (one or two weeks after). The gonad was dissected and pools of four gonads (3 pools R and 3 pools S per experiment) were prepared for total RNA extraction for real-time PCR analysis.

## 2. RNA preparation

Total RNA was isolated by the same manipulator using Extract-all (Eurobio) at concentration of 1ml/50 mg of tissue. RNA quality was assessed using RNA nano chips and Agilent RNA 6000 nano reagents (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured using ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies), and RNA samples were stored at -80° C until use.

For microarray hybridizations, 5µg of total RNA were directly labeled by reverse transcription and were then purified by using the Direct ShipShot Labeling kit (Promega), according to the manufacturers' recommendations. This reaction has been performed for each of the 24 gonad samples with Cy5 (red) incorporation. The reference sample was Cy3-labeled (green) in 24 separated tubes following the same protocol. The 24 Cy3-labeled cDNAs were next pooled and re-dispatched into 24 samples to get an homogenized reference. All the dye incorporation rates were checked by ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies) to ensure a good correlation between all the samples.

For real-time PCR analysis, RNA samples were first treated with DNase I (1 U/ $\mu$ g total RNA, Sigma). Reverse transcription (RT) was then carried out as described by Huvet *et al.* (2003) using 4 $\mu$ g of total RNA from each sample.

### 3. *cDNA microarray construction*

#### 3.1 *cDNA clones and preparation of microarray probes*

Sequences coming from different projects (Marine Genomic Network, Tanguy *et al.*, 2008 and Aquafirst, Fleury *et al.*, submitted) added to sequences previously available in Genbank, were assembled in a unique normalized database to form 9,276 sequences containing 1,758 contigs and 7,518 singletons (Fleury *et al.*, submitted, <http://www.sigenae.org/aquafirst/>). Considering all the cDNA clones, positive and negative controls (including water, spotting buffer, and guide dots of 5, 50, 100 and 200 ng/l), a total of 11,088 probes, representing 9,058 ESTs of oysters, were prepared for printing by the Max Planck Institute (Berlin, Germany). Inserts were amplified by standard PCR using universal primers (M13 forward and reverse) located on the cloning vector in 100  $\mu$ l reaction buffer. A small aliquot of each PCR reaction was run in agarose gels for quality control. Inserts that failed to amplify (~ 2 %, data not shown) were not replaced. PCR products were precipitated with a solution of ethanol/NaAcetate at  $-20^{\circ}$ , centrifuged, rinsed with 70% ethanol, dried at room temperature, and resuspended in 30 $\mu$ l of printing buffer (3X SSC and 0.1% N-lauroylsarcosine).

#### 3.2 *Microarray printing*

Microarray slides were printed by the Max Planck Institute (Berlin, Germany) with a GMS417 Arrayer (Genetic Microsystems) on poly-L-lysine-coated slides prepared locally with standard protocol. Each slide contained a total of 11,088 features spotted in duplicate to reduce positional bias of the fluorescence readout, divided up into 48 blocks containing 22 rows and 21 columns. Replicate spots were located within the same block (*i.e.* spotted with the same pin) but were not next to each other in the block. Printed slides were exposed to UV light for cross-linking, blocked in a succinic anhydride/ sodium borate solution, and excess DNA probe material was washed off in a water bath at  $95^{\circ}$ C. Blocked slides were dehydrated in a bath of 100% ethanol, centrifuged, and stored in a dark, cool and dry location until use.

#### 4. Microarray hybridizations and scanning

Equimolar amounts of cDNA samples and cDNA reference labeled with Cy5 and Cy3 respectively, were SpeedVac evaporated and were mixed into a single pool, with the hybridization buffer (ChipHybe™ hybridization buffer, Ventana Discovery, Tucson, AZ, USA). Then, they were cohybridized on the same microarray slide, in a Ventana hybridization station (Ventana Discovery, Tucson, AZ, USA). Hybridizations, performed at INRA IFR 140 transcriptomic facility (Rennes, France), were conducted overnight at 42°C in a humidified chamber, according to the manufacturer's instructions, after the pre hybridization step (with ChipSpread buffer, containing 4×SSC and 0.2% SDS). The arrays were washed two times with Ribowash solution (0.1 M Tris, 0.05 M EDTA, and 0.4 M NaCl), and two times with 0,1×SSC, and finally centrifuged for drying.

After the hybridization step, microarray slides were scanned using a Scanner Genepix 4000B (Axon Instruments Inc.) with the following parameters: Cy 5 Photo Multiplier Tube (PMT): 550 and Cy 3 PMT: 590. This process was repeated for each of the 24 hybridized slides. The images (16-bits TIF images) were then analyzed with the Genepix pro 5.1 software (Axon Instruments Inc.) according to the manufacturer's instructions. Spots were filtered according to their quality, the criteria being the spot shape, the median intensity of the spot and the homogeneity of the local background pixels as well as the spot pixels intensities. Spots showing inadequate signals were eliminated, as well as those with noisy backgrounds or with more than 20% of saturated pixels in both channels.

#### 5. Microarray Data analysis

##### 5.1 Correction and normalization

Transformation and normalization of hybridization data were performed to minimize variation arising from technical differences in RNA quality, probe labeling, and hybridization conditions between experiments. First, a logarithmic transformation was performed for each signal intensity (giving the “log values”). Considering that expression of the majority of the spotted genes do not change in function of the experimental conditions, the sum of “log values” and the variance of “log values” should be the same across the different samples. For that reason, the “log values” have been median centered as described in Rezen *et al.* (2008). Correction for differences in the variance across the range of gene expression levels were next performed by the formula :  $(\text{corrected Cy5 log value})_i = (\text{Cy5 log value})_i - (\text{Cy3 log value})_i$

+ (mean Cy3 log value) where Cy5 log value represents sample signal intensity, Cy3 log value the reference signal intensity and mean Cy3 log value represents the mean of all green values obtained for the gene 'i' through the different conditions.

### *5.2 Identification of differentially expressed genes*

Genes differentially expressed between R and S lines along the studied dates were determined statistically ( $p$ -value  $< 1.10^{-4}$ ) by variance analysis using GeneANOVA software (Didier *et al.*, 2002). Consequently, the False Discovery Rate (FDR) associated to the selected genes is determined by the formula : [Total number of analyzed genes (9058) x  $p$ -value ( $1.10^{-4}$ ) / Number of differentially expressed genes] x 100. As GeneANOVA requires no missing values, we implemented the program with an imputed data set in which the missing values have been calculated from the mean of 10 non-missing nearest neighbor (obtained with SAM program, Tusher *et al.*, 2001). For this analysis, we constructed a statistical model including 3 factors: line (R or S), date of sampling (date 1, 2, 3 and 4), technical replicate (spots deposited in duplicate on the slide). These factors represent a set of interacting parameters reflecting differential gene expression across the experimental conditions. All identified genes were kept for hierarchical clustering analysis (realized with TmeV, <http://www.tm4.org/mev.html>) in order to characterize the expression profiles of statistically relevant genes. Hierarchical clustering is based on average linkage to find the pairs of genes that behave most similarity in all samples. It then progressively adds other genes to the initial pairs to form clusters of putatively correlated genes (Eisen *et al.*, 1998). Clusters of interest were identified by visual inspection using TmeV.

### *5.3 Gene ontology analyses*

Gene ontology analysis was carried out for all genes spotted on the array, using the program BLAST2GO (Conesa *et al.*, 2005). This program is a Java application enabling gene ontology (GO) assignment, based on data mining on sequences for which no GO annotation is currently available. FASTA-formatted sequences representing all the spotted ESTs, were uploaded to the program and BLASTX carried out against the Swissprot database. GO terms associated with the hits ( $e$ -value  $< 1.e^{-5}$ ) were retrieved by the program and queries were annotated based on hit similarity and GO evidence codes.

## 6. Gene expression analysis by real-time PCR of some selected ESTs

The RNA prepared for microarray analysis, and RNA previously sampled in different experiments were used for gene expression analysis by real-time PCR of 8 selected genes targeted on the basis of their putative relevant annotation. One non-annotated EST was also kept for real-time PCR analysis on the basis of its expression levels between R and S samples. PCR efficiency (E) was estimated for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of the reference cDNA to ensure that E ranged from 98 to 100%. Primer names, accession numbers, PCR efficiencies and sequences are listed in Table 1. Amplification of elongation factor I (ef I) cDNA (primers described in Fabioux *et al.*, 2004) was performed to confirm the steady-state level of expression of a housekeeping gene, providing an internal control for gene expression. No significant difference between Ct values was observed for the ef I between R and S samples along the sampling dates (t-test:  $p = 0.69$ ; coefficient of variation = 5.1 %).

The real-time PCR amplifications were carried out in triplicates as described in Huvet *et al.* (2004) with the iQ SYBR Green Supermix (Biorad) using an Icyler (Biorad). Each run included the cDNA reference, negative controls (each total RNA sample with DNase I treatment), and blank controls (water) analyzed for each primer pair. Melting curve analysis was systematically performed for all genes in order to verify the specificity of the PCR product. For a studied gene “i”, results were expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  with  $\Delta Ct = Ct(i) - Ct(\text{ef I})$  and  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ of cDNA sample} - \Delta Ct \text{ of the cDNA reference}$ . Student *t*-tests were realized on the  $\Delta\Delta Ct$  values of each gene between Resistant and Sensitive oyster lines, as proposed in Yuan *et al.*, 2006.

## RESULTS

### *Survival of the lines during the experiment*

From April to the beginning of June, no mortality was detected for both R and S lines. The first mortalities were observed in the middle of June, with the mortality peak occurring the July, 7<sup>th</sup>. At the end of the experiment, 56% and 22% of cumulative mortality was observed for S and R lines respectively, representing a mortality rate 2.5 times significantly higher for S oysters (Figure 1). R and S oysters sampled during dates 1 to 4 were kept for the

microarray analysis. Oysters sampled on July 20<sup>th</sup> (date 5) were not considered, as only surviving oysters were available at that time, generating a bias in the sampling strategy (surviving S oysters are less representative of the “sensitive” character).

#### *Global annotation analysis of the spotted ESTs*

Transcriptomic analysis was conducted on R and S oyster lines using a cDNA microarray containing 9,058 clones from different oyster libraries. Blast analyses revealed that 28 % of the spotted clones were annotated with functional annotation, 24 % showed hits with sequences in the databanks with no functional annotation, and 48 % with no hits (data not shown). Gene ontology (GO) analyses of the annotated clones showed they are involved in more than 1,000 distinct biological processes. The variety of these processes can be explained by the nature of the array, containing cDNA from libraries of different tissues, sampled in different conditions. As expected, some of these biological processes are related to cellular process, metabolic process or biological regulation. The diversity of the biological processes represented among this slide will be very helpful to study the complexity of the summer mortality phenomena, which may affect several molecular pathways.

#### *Quality and reproducibility of data*

After hybridization and scanning steps, we obtained spots of good quality, with high intensity (showed by the low PMT voltage used for the scan, Lyng *et al.*, 2004), homogeneous size and shape and very low background. Indeed, filtering steps (described in the Materials and Methods section) removed less than 1% of the spotted clones. Moreover, the mean of coefficient of correlation obtained by scatter plot for microarray values was 0.94 for technical replicates, and 0.90 for biological replicates.

#### *Identification of differentially expressed genes by ANOVA*

ANOVA analysis revealed that none of the genes was found significantly differentially expressed according to the factor “technical replicate”, while 2,114 and 34 genes varied significantly according to the factors “date of sampling” and “lines” respectively. These ESTs have been selected as differentially expressed with a  $p$ -value  $< 1.10^{-4}$ .

Consequently, the False Discovery Rate (FDR) for the 34 selected ESTs differentially expressed between R and S lines is 2.6%.

The ANOVA result is graphically represented on Figure 2, showing genes with a large part of the variation due to the factor “line” and with a high statistical significance. Among these 34 selected genes, 16 showed apparent homology to gene of known function among the SwissProt database (E value <  $1.e^{-5}$ ). For these annotated ESTs, the top hits (Table 2) were carefully studied and most of the publications associated with the hits were examined to extract the most relevant annotation and information for each EST.

A hierarchical clustering by average linkage was performed to determine whether the genes identified by ANOVA as being differentially expressed exhibited any coordinate patterns of expression between studied samples. By visual inspection, 2 clusters of coordinately regulated genes were identified (Figure 3), each containing 17 ESTs. The combination of the two types of analysis, annotation studies and clustering, allowed to group 17 genes over-expressed in R samples comprising ESTs annotated as catalase, acylcarnitine carrier protein, neuropeptide Y receptor, scavenger receptor, MAP-kinase-activated protein, oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like, WD repeat-containing protein 92, hexokinase, cytochrome c oxidase, superoxide dismutase, dopamine receptor, and 6 non-annotated ESTs. Conversely, the 17 ESTs found over-expressed in S samples comprised ESTs annotated as succinate dehydrogenase, tetratricopeptide repeat protein 28, heat shock protein 70kDa, ependymin related protein and CD109 antigen precursor and 12 non-annotated ESTs (Table 2).

#### *Validation of microarray data by real-time PCR*

We have used two ways to examine the quality data produced by the microarray. We first take advantage to the redundancy of the genes included on the slides by comparing the expression data obtained for different ESTs encoding the same genes (*e.g.* ESTs encoding Calmodulin, Myosin, Ubiquitin). These ESTs had similar expression patterns as detected by the microarray hybridization, with a coefficient correlation between spots of the same gene of 0.92, 0.91 and 0.95 respectively for the 3 tested genes. Secondly, we assessed the degree of correlation between microarray expression data obtained for 9 differentially expressed genes (Table 2) with relative expression levels measured using real-time PCR on the same samples. Eight genes selected for validation were chosen on the basis of their putative annotation linked with relevant biological processes previously suspected to act in the mortality phenomena and one gene for its high expression levels between R and S lines. A significant

correlation was observed ( $R^2 = 0.89$ ,  $p = 0.002$ ) between log ratio between R and S obtained by microarray and by real-time PCR (data not shown).

#### *Study of 9 differentially expressed genes of different R and S samples*

To further document the genetic component (*i.e.* the “line” effect), we assayed the level of mRNA of the 9 selected genes by real time PCR on R and S samples collected in 4 other experiments between the R and S lines, coming from different generation, age and environment (already studied in Fleury *et al.*, 2008). A similar up and down regulation between R and S was observed for the whole 4 experiments between microarray and real-time PCR, for all tested genes, even though differences were not always significant (Figure 4). More precisely, results showed that ESTs corresponding to dopamine receptor, neuropeptide Y receptor and “unknown EST” (CK172373) were systematically differentially expressed between R and S for the 4 experiments. SuperOxide dismutase, CD-109, acylcarnitine carrier protein and oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like were significantly differentially expressed in the two experiments (1 and 2) where significant mortality was observed. Indeed, percentages of mortality for R and S lines were, respectively, 4% and 74% for 4-months old G2 oysters (experiment 1); 30% and 80% for 4 months-old G3 oysters (experiment 2). In 16 month-old oysters, mortality appeared much lower (with 5% and 14% of mortality for R and S in experiment 3; and 8% and 5% for experiment 4). Finally, ESTs encoding heat shock protein 70 and cytochrome c oxidase were found differentially expressed between R and S lines for only one of the 4 studied experiments (experiments 2 and 4, respectively) in addition to the microarray experiment.

## **DISCUSSION**

To look for molecular markers linked to the resistance of oyster, a transcriptional analysis between selected resistant and sensitive lines have been realized. We conducted a genome-wide expression profiling of gonad of R and S lines during an *in situ* temporal survey preceding a mortality event in order to identify summer mortality resistant markers through the differentially expressed genes which should correspond to the selected character. This was done in the same conditions than those used for the divergent selection of the lines (Degrémont *et al.*, 2005). The tissue “gonad” was selected for this study according to the potential relevance of the reproduction in the mortality phenomena (Samain *et al.*, 2007).

The ANOVA realized according to 3 factors (“technical replicates”, “date of sampling” and “lines”) showed that no differentially expressed ESTs were found according to the factors “technical replicate”, and that a total of 2,114 ESTs varied significantly according to the four sampling dates, independently of the R or S line. This high number of ESTs should be explained by the fact that dates of sampling represented more than one month and a half of the active gametogenesis (May to the end of June), during which the oysters sustain large variation of physiological processes associated to the development of the gonad, as already shown for the trout (Baron et al, 2005; Elis *et al.*, 2008). The environmental variations observed in the field during this period (increasing of water temperature, hypoxia, trophic resources availabilities) should also induce change of gene expression, as previously observed by Samain & McCombie (2008).

A total of 34 differentially expressed ESTs were identified as being only “line” dependent ( $p$ -value  $< 1.10^{-4}$ ). This number of ESTs differentially expressed between R and S selected lines should be compared to the few candidates obtained in several other experiments comparing genetically resistant or sensitive animals, as observed by Keane *et al.* (2006) in sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes or by Sarson *et al.* (2008) in resistant and susceptible chickens to Marek’s disease. The clustering analysis showed that 17 ESTs were over-expressed and 17 ESTs were under-expressed in R compared to S, suggesting that the differential between the two lines is not only linked to a physiological weakness of S oysters leading to a general down regulation of most of the genes analyzed. The expression patterns of nine of these selected genes, chosen on the basis of their annotation and/or their high expression levels between R and S samples, were further confirmed by real-time PCR. Indeed, the confirmation was realized on the same samples as those used for microarray analysis, showing a very good correlation of gene expression assay between the two methods ( $R^2 = 0.9$ ).

In order to identify and prioritize genes that should constitute candidates of interest for functional studies and provide candidate markers for QTLs analysis, the expression patterns of these nine selected genes have been studied between R and S lines sampled in different conditions. Indeed, in to focus on the genetic component, rather than the effect of age (4 or 16 months), generation (second or third generation) or environment (nursery, South Brittany or Normandy field), we tested the differential of these 9 selected genes between R and S samples through four other experiments. This analysis has allowed sorting some candidates according

to their potential relevance in the mortality phenomena, as they could be systematically associated to mortality episodes, independently of other parameters. The obtained results allowed us to group three selected ESTs as systematically significantly differentially expressed between R and S, including dopamine receptor, neuropeptide Y receptor and the non-annotated CK172373 candidates. Other four candidates including CD109 antigen precursor, oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like, acylcarnitine carrier protein and superoxide dismutase were found significantly differentially expressed between R and S only for the two experiments displaying significant mortality suggesting that they should interplay in it. A lower consideration was credited to Heat shock protein 70 (Hsp70) and to cytochrome c oxidase, as these candidates were found significantly differentially expressed between R and S in only one of the four experiments.

The seven ESTs found always significantly differentially expressed between R and S when significant mortality was observed constitute preferential candidates markers for QTLs analysis. Additionally, QTL linkage studies have recently been conducted in order to map regions of the genome which affect this trait (Sauvage, 2008). In our case, as soon as markers linked to QTL identified for resistance to summer mortality trait, these markers could be used for markers assisted selection. There is a great potential in combining these two techniques as co-localization of genes identified by transcriptome studies and regions of the genome linked to the studied trait (ie QTLs) contribute to identify genes that affect this trait (Darvasi, 2003).

Finally, these seven candidates revealed consistent genes involved in particular processes, previously suspected to be involved in the summer mortality phenomena (Samain *et al.*, 2007). For example, the EST corresponding to oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like (og-TGF $\beta$ -like), belonging to the Transforming Growth Factor  $\beta$  family, is found to be over-expressed in R compared to S in conditions leading to summer mortality, as already observed by Fleury *et al.* (2008). According to its potential role in germinal cells proliferation (Fleury *et al.*, 2008), it was suggested a negative effect of og-TGF $\beta$ -like in gonad development of oyster. This has already been observed for some other members of the TGF $\beta$  superfamily with for example, the involvement of TGF $\beta$ 1 in the inhibition of gonadotropin and 17-alpha, 20-beta-dihydroxyprogesterone(DHP)-induced maturation of zebrafish oocyte (Kohli *et al.*, 2005). The identification of such candidate involved in reproduction and differentially expressed according to the genetic lines gives additional clue to consider the reproductive investment as one of the factor linked to survival, as it was already suggested in several other invertebrates

(Myrand *et al.*, 2000; Partridge & Prowse, 1997). Indeed, it was already demonstrated that a higher reproductive investment of the animals has negative effect on survival, through the “reproductive cost” and its repercussions on the energy budget (Browne *et al.*, 1982). For the oyster, trade-offs between survival and reproduction have already been suggested, meaning that reproductive effort improved at the expense of survival (Ernande *et al.*, 2004).

If we consider that the reproduction and its regulation play a major part in the interaction leading to the summer mortality, the identification of a candidate annotated as neuropeptide Y receptor, statistically over expressed in R compared to S, appears very relevant. Indeed, members of this family, through the ligand-receptor interaction (Lecklin *et al.*, 2002), have compelling regulatory effect on reproduction (Magni *et al.*, 2000; Schneider, 2004), by down-regulating reproductive investment when energy storage is deficient (Bojkowska *et al.*, 2008). The higher expression of this neuropeptide Y receptor in R lines should therefore regulates energy flows to lower reproductive investment, by decreasing egg mass titer such as already observed in *Lymnea stagnalis* (de Jong-Brink *et al.*, 2001).

The metabolic effort of adaptation of R oysters for maintenance compartment should also be supported by the higher expression of dopamine receptor in R oysters, as it could play a part in the regulation of oxygen assimilation, allocation of energy, growth, reproduction and immune defense (Lacoste *et al.*, 2001a, 2001b, 2001c), through the stimulation of cyclic AMP during a stress response (Gotzes *et al.*, 1994). Moreover, its effect on gamete development has been demonstrated in freshwater mussels (Gagné and Blaise, 2003), where dopamine reduced growth of the gonad (Dufour *et al.*, 2005). Its higher expression in R lines should therefore be linked with the lower reproduction investment observed for these lines.

In addition to the fact that reproductive investment has consequence in term of energy consumption, it is now established that reproduction decreases antioxidant defenses, illustrating that reproduction creates an oxidative stress cost (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004). The reproduction strategies should influence the total antioxidant defenses, as it was already observed in insects (Wang *et al.*, 2001; Alonso-Alvarez *et al.*, 2004). This hypothesis make particularly relevant the identification of ESTs differentially expressed between R and S annotated as catalase and superoxide dismutase, known as main antioxidant enzymes, playing an important role in maintaining cellular homeostasis and antioxidant defense by removing Reactive Oxygen Species (ROS) produced in case of stress (Jo *et al.*, 2007). Moreover, it has been recently shown that this superoxide dismutase may participate in the regulation of the inflammatory response induced by sepsis by detoxifying internal oyster tissues or by improving the ability of the hemocytes to resist oxidant injury (Gonzalez *et al.*, 2005). Indeed,

activation and/or deterioration of the electron transport chain in mitochondria is the principal cause of oxidative stress increase by an excessive production of toxic oxygen radicals. Such effects could be related to the presence of chemicals pollutants but also to environmental stressors (Samain & McCombie, 2008). In these conditions, cells use consequently many antioxidant defense strategies and consume much more energy to control their level of ROS. When production of free radicals is excessive, some DNA damage, carbohydrate oxidation (Manduzio *et al.*, 2005) and disturbance of the immune defense system were observed (Gagnaire *et al.*, 2006). Then, a greater capacity of R oysters to detoxify cell through antioxidant enzymes should play a role in mortality as previously demonstrated by Lambert *et al.*, (2007) and Soudant *et al.*, (2002), strengthened here by the over-expression in R of these antioxidant enzymes. In vertebrates, stress response stimulates metabolic pathways such as AMP-dependent protein kinase (AMPK) pathway that turns-off energy-consuming processes and turns on those that generate ATP such as lipid oxidation (Hardie, 2003). Indeed, AMPK function is regulated at the post-translational level (Krämer *et al.*, 2007) and AMPK activity stimulates mitochondrial fatty acid oxidation to produce energy (Hardie, 1992). In our study, the higher expression of EST annotated as acylcarnitine carrier protein (ACP) could support the hypothesis of an increased potential of R oysters for energy production through lipid oxidation. Indeed, ACP plays important function of fostering the oxidation of long-chain fatty acids by the mitochondria and stimulating protein-sparing action by increasing energy derived from lipids (Bremer, 1983; Zhang *et al.*, 2005). Its higher expression level detected in R oysters compared to S should therefore suggest a better optimization of the energy production through the lipid metabolism.

## CONCLUSION

The present study has provided an extensive view of the genetic basis underlying differences between lines selected for resistance or susceptibility to summer mortality, leading to differences in their reproduction, energy and antioxidant defenses. However, it is important to keep in mind that microarray analyses should be considered here as a first screening of genes of interest before more specific and accurate one-by-one investigation. To further evaluate the potential role of each gene in the resistance to summer mortality, this work urges the development of functional studies to unravel the function of these genes. These studies will also be use on the 18 ESTs presenting no annotation but exhibiting correlated patterns of expression with known genes differentially expressed between R and S, as showed by the

hierarchical clustering analysis. Knowledge of spatio-temporal or stimulus-dependent expression patterns of a given gene represents valuable information to assign a putative function to a gene. However, gene function is primarily assessed on the basis of altered phenotypes associated with gene disruption. The development and use of functional analysis of these selected genes will be one of the starting point for further research with the aim of elucidating the summer mortality phenomena, and will be associated to the mapping of these selected genes in order to develop a marker assisted or gene assisted selective breeding program to improve summer survival in *C. gigas*. Finally, the 34 selected candidates of this study should be further use for diagnostic profiles to detect the susceptibility to summer mortality.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study takes place in the European program “Aquafirst” and in the network of excellence “Marine Genomic Europe”.The authors are grateful to G. Davey, P. Lindeque and J. Shaw for their support during the course of this work. We are indebted to X for his help for editing the English language. We also thank P. Prunet, A. Le Cam, S. Mativet, G. Leborgne from INRA-SCRIBE for excellent technical assistance, the SIGENAE team (INRA Toulouse, France) for bioinformatic tools development. We acknowledge the Max Planck Institute of Berlin (Germany). The authors are indebted to J. Lafore and V. Quilien for technical assistance.

## REFERENCES

1. Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B, Sorci G: **Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction.** *Ecology Letters* 2004, **7**(5):363-368.
2. Baron D, Houllgatte R, Fostier A, Guiguen Y: **Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout.** *Biol Reprod* 2005, **73**(5):959-966.
3. Berthelin C, Kellner K, Mathieu M: **Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France).** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2000, **125**(3):359-369.
4. Bojkowska K, Hamczyk MM, Tsai HW, Riggan A, Rissman EF: **Neuropeptide Y influences acute food intake and energy status affects NPY immunoreactivity in the female musk shrew (*Suncus murinus*).** *Hormones and behavior* 2008, **53**(2):342-350.
5. Boudry P, Dégremont L, Haffray P: **The genetic basis of summer mortality in Pacific oyster spat and potential for improving survival by selective breeding in France.** In: *Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* The Morest Project*. Edited by Quae, vol. 4; 2008: 43.
6. Bremer J: **Carnitine: metabolism and function.** *Physiological Reviews* 1983, **63**:1420-1480.
7. Browne RA: **The costs of reproduction in brine shrimp.** *Ecology* 1982, **63**(1):43-47.
8. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M: **Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** *Bioinformatics* 2005, **21**(18):3674-3676.
9. Darvasi A: **Genomics: Gene expression meets genetics.** *Nature* 2003, **422**(6929):269-270.
10. de Jong-Brink M, ter Maat A, Tensen CP: **NPY in invertebrates: molecular answers to altered functions during evolution.** *Peptides* 2001, **22**(3):309-315.
11. Degrémont L, Bedier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain J, Boudry P: **Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*).** *Aquaculture* 2005, **249**:213-229.
12. Degrémont L, Ernande B, Bédier E, Boudry P: **Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth.** *Aquaculture* 2007, **262**:41-53.
13. Didier G, Brezellec P, Remy E, Henaut A: **GeneANOVA--gene expression analysis of variance.** *Bioinformatics* 2002, **18**(3):490-491.
14. Dufour S, Weltzien FA, Sebert ME, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, Pasqualini C: **Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1040**:9-21.
15. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(25):14863-14868.
16. Elis S, Batellier F, Couty I, Balzergue S, Martin-Magniette ML, Monget P, Blesbois E, Govoroun MS: **Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen.** *BMC Genomics* 2008, **9**:110.
17. Ernande B, Boudry P, Clobert J, Haure J: **Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance.** *J Evol Biol* 2004, **17**(2):342-356.

18. Fabioux C, Pouvreau S, Le Roux F, Huvet A: **The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas***. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **315**(4):897-904.
19. Fleury E, Huvet A, Lelong C, de Lorgeril J, Boulo V, Gueguen Y, Bachère E, Tanguy A, Moraga D, Fabioux C *et al*: **Generation and analysis of a large scale repertoire of ESTs from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* assembled in a unique clearing-house**. *submitted to BMC Genomics*.
20. Fleury E, Fabioux C, Lelong C, Favrel P, Huvet A: **Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas***. *Gene* 2008, **410**(1):187-196.
21. Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T: **Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry**. *Cell Biol Toxicol* 2006, **22**(1):1-14.
22. Gagne F, Blaise C: **Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata***. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003, **136**(2):117-125.
23. Gonzalez M, Romestand B, Fievet J, Huvet A, Lebart MC, Gueguen Y, Bachere E: **Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS**. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **338**(2):1089-1097.
24. Gotzes F, Balfanz S, Baumann A: **Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors**. *Receptors Channels* 1994, **2**(2):131-141.
25. Hardie DG: **Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase**. *BBA* 1992, **1123**:231-238.
26. Hardie DG: **Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status**. *Endocrinology* 2003, **144**:5179-5183.
27. Huvet A, Daniel JY, Quéré C, Dubois S, Prudence M, Van Wormhoudt A, Sellos D, Samain JF, Moal J: **Tissue expression of two alpha-amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effect of two different food rations**. *Aquaculture* 2003(228):321-333.
28. 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):211-220.
29. Jenny MJ, Chapman RW, Mancia A, Chen YA, McKillen DJ, Trent H, Lang P, Escoubas JM, Bachere E, Boulo V *et al*: **A cDNA microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas***. *Mar Biotechnol (NY)* 2007, **9**(5):577-591.
30. Jo PG, Choi YK, Choi CY: **Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure**. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008, **147**(4):460-469.
31. Keane OM, Zadissa A, Wilson T, Hyndman DL, Greer GJ, Baird DB, McCulloch AF, Crawford AM, McEwan JC: **Gene expression profiling of naive sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes**. *BMC Genomics* 2006, **7**:42.
32. Kohli G, Clelland E, Peng C: **Potential targets of transforming growth factor-beta1 during inhibition of oocyte maturation in zebrafish**. *Reprod Biol Endocrinol* 2005, **3**:53.

33. Krämer DK, Al-Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves PM, Krook A: **Role of AMPK and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle.** *J Biol Chem* 2007, **282**(27):19313-19320.
34. Lacoste A, Malham SA, Cueff A, Jalabert F, Gelebart F, Poulet SA: **Evidence for a form of adrenergic response to stress in the mollusc *Crassostrea gigas*.** *Journal of Experimental Biology* 2001a, **204**:1247-1255.
35. Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cueff A, Poulet SA: **Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*.** *Appl Environ Microbiol* 2001b, **67**(5):2304-2309.
36. Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA: **Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*.** *Gen Comp Endocrinol* 2001c, **122**(2):181-188.
37. Lambert C, Soudant P, Delaporte M, Moal J, Boudry P, Jean F, Huvet A, Samain J-F: **Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites.** *Aquaculture* 2007, **270**:276-288.
38. Lang P, Langdon C, Camara M: **Predicting the resistance of adult pacific oysters (*Crassostrea gigas*) to summer mortality.** *J Shellfish Res* 2008, **27**(2):470-470.
39. Lecklin A, Lundell I, Paananen L, Wikberg JE, Mannisto PT, Larhammar D: **Receptor subtypes Y1 and Y5 mediate neuropeptide Y induced feeding in the guinea-pig.** *Br J Pharmacol* 2002, **135**(8):2029-2037.
40. Lyng H, Badiie A, Svendsrud DH, Hovig E, Myklebost O, Stokke T: **Profound influence of microarray scanner characteristics on gene expression ratios: analysis and procedure for correction.** *BMC Genomics* 2004, **5**(1):10.
41. Magni P, Motta M, Martini L: **Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function.** *Regul Pept* 2000, **92**(1-3):51-56.
42. Manduzio H, Cosette P, Gricourt L, Jouenne T, Lenz C, Andersen OK, Leboulenger F, Rocher B: **Proteome modifications of blue mussel (*Mytilus edulis* L.) gills as an effect of water pollution.** *Proteomics* 2005, **5**(18):4958-4963.
43. Myrand B, Guderley H, Himmelman J: **Reproduction and summer mortality of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence.** *Mar Ecol Prog Ser* 2000, **197**:193-207.
44. Partridge L, Prowse N: **The effects of reproduction on longevity and fertility in male *Drosophila melanogaster*.** *J Insect Physiol* 1997, **43**(6):501-512.
45. Rezen T, Juvan P, Fon Tacer K, Kuzman D, Roth A, Pompon D, Aggerbeck LP, Meyer UA, Rozman D: **The Sterolgene v0 cDNA microarray: a systemic approach to studies of cholesterol homeostasis and drug metabolism.** *BMC Genomics* 2008, **9**:76.
46. Samain JF, Dégremont L, Soletchnik P, Haure J, Bédier E, Ropert M, Moal J, Huvet A, Bacca H, Van Wormhoudt A *et al*: **Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process.** *Aquaculture* 2007, **In press**.
47. Samain JF, McCombie H: **Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project.**, Quae edn; 2008.
48. Sarson AJ, Parvizi P, Lepp D, Quinton M, Sharif S: **Transcriptional analysis of host responses to Marek's disease virus infection in genetically resistant and susceptible chickens.** *Anim Genet* 2008, **39**(3):232-240.

49. Sauvage C: **Développement de marqueurs moléculaires liés à la résistance à la mortalité estivale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Approche QTL.** University of La Rochelle; 2008.
50. Schneider JE: **Energy balance and reproduction.** *Physiol Behav* 2004, **81**(2):289-317.
51. Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Gouilletquer P: **Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation.** *Aquatic Living Resources* 1997, **10**:177-185.
52. Soudant P, Lambert C, Choquet G, Ford S, Paillard C, Delaporte M, Moal J, Boudry P, Soletchnik P, Joly J-P *et al*: **Relationships between summer mortalities and defense mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions.** *J Shellfish Res* 2002, **21**:407.
53. Tanguy A, Bierne N, Saavedra C, Pina B, Bachere E, Kube M, Bazin E, Bonhomme F, Boudry P, Boulo V *et al*: **Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution.** *Gene* 2008, **408**(1-2):27-36.
54. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(9):5116-5121.
55. Wang Y, Salmon AB, Harshman LG: **A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*.** *Exp Gerontol* 2001, **36**(8):1349-1359.
56. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr.: **Statistical analysis of real-time PCR data.** *BMC Bioinformatics* 2006, **7**:85.
57. Zhang DM, Yoshimatsu T, Furuse M: **Effects of L-carnitine enrichment on the population growth, egg ratio and body size of the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*.** *Aquaculture* 2005, **248**(1-4):51-57.

## TABLES

Table 1: Sense and anti-sense sequences of primer pairs for real-time PCR, used to amplify cDNA of 9 selected ESTs differentially expressed between Resistant and Sensitive oysters. PCR efficiencies were determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of a cDNA reference.

GenBank #	EST name	Forward primer	Reverse primer	Efficiency (%)
AM855194	Acylcarnitine carrier protein	GTG GCG TGT GTC TGG TAG TC	TCC TTT ATA CAG CGG CGT CT	99.7
AM856249	Neuropeptide Y receptor	GTG GCT TGT GGG CTT ATT GT	CTG AAA TCC GAA TGG ACG AC	101.9
AM856765	Oyster-Gonadal-TGF $\beta$ -like	TTG GAC ATC AGG GAA ATT CTG	CCA AAC GAA ACG ACA GGA AC	98.7
CX068896	Cytochrome c	GCT TAC GCC GGT CTG AAC T	GCT AAA GGG ATT GGC ACC TC	101.6
CU681620	Superoxide dismutase	AGT CTG GTC GCA CAT TCT TGT	CAT GTG CCA ATC AAG ATC CTC	101.4
FP091069	Dopamine receptor	ATC ACG AGT AAG GCG ACG AG	CGG TGT TTG GTA ATG TGC TG	101.3
AM854673	Heat shock 70 kDa	CCT GCA ATA TGG AGT GAT TCG	CTT CCG GTT CAT AAG CCA TC	100.5
CX069254	CD109 antigen precursor	CTG GTT GGC TGG CTC ATA GT	ATT TCC ACC ACT CCA ACC TG	98.8
CK172373	No annotation	ACA TCA GGT TTA CGG CGT TC	TGC CCA CCA ATA ACA ATG C	98.7

Table 2: List of differentially expressed ESTs between Resistant and Sensitive gonad oyster lines, obtained by microarray analysis.

Genes subsequently studied by real-time PCR are bolded. GenBank accession numbers are indicated. The Sigenae contig name (<http://www.sigenae.org/aquafirst/>) used for Blast comparison against the Swiss-Prot database is shown. Resulting best hit (Swissprot hit description) and corresponding score (E-Value) are indicated. NA indicates “No Available annotation” in the Swiss-Prot database. Cluster I groups ESTs under-expressed in R compared to S, cluster II groups ESTs over-expressed in R compared to S.

Genbank #	Sigenae name	Swissprot hit description	E-value	Cluster
FP089729	oyih10b03k06r1_m13r.1.a.cg.1	Succinate dehydrogenase	2E-62	
AM855200	cdn20p0002o22.f.1.a.cg.1	NA		
AM855201	cdn20p0002o24.f.1.a.cg.1	NA		
AM858582	cdn37p0004k03.f.1.a.cg.1	NA		
AM858905	cdn37p0005i17.f.1.a.cg.1	NA		
AM854479	cdn19p0004j23.f.1.a.cg.1	NA		
BQ426558	BQ426558.1.a.cg.1	NA		
BQ426632	BQ426632.1.a.cg.1	NA		
AM237704	AM237704.1.a.cg.1	NA		Cluster I
CU682072	oygd09b08j20r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
CU683250	oyge09b11e21r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
CU683279	oyge09b11e22r1_m13rev.1.a.cg.1	Tetratricopeptide repeat protein 28	2E-25	
CU684430	oyge10b14l11r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
CU685075	oypg10b07l21r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
<b>AM854673</b>	<b>cdn20p0001d16.f.1.a.cg.1</b>	<b>Heat shock 70 kDa protein</b>	<b>5E-24</b>	
CU682651	oygd10b10m11r1_m13rev.1.a.cg.1	Mammalian ependymin-related protein	2E-9	
<b>CB617381</b>	<b>CB617381.1.a.cg.1</b>	<b>CD109 antigen precursor</b>	<b>7E-12</b>	
AM853618	cdn19p0002c05.f.1.a.cg.1	Catalase	2E-83	
<b>AM855194</b>	<b>cdn20p0002o15.f.1.a.cg.1</b>	<b>acylcarnitine carrier protein</b>	<b>1E-35</b>	
AM855858	cdn20p0005g01.f.1.a.cg.1	NA		
AM856073	cdn21p0001b19.f.1.a.cg.1	NA		
<b>AM856249</b>	<b>cdn21p0001j08.f.1.a.cg.1</b>	<b>Neuropeptide Y receptor</b>	<b>5E-6</b>	
AM856616	cdn21p0002j12.f.1.a.cg.1	Scavenger receptor	9E-8	
AM856617	cdn21p0002j13.f.1.a.cg.1	MAP kinase-activated protein	1E-77	
<b>AM856765</b>	<b>cdn21p0003a17.f.1.a.cg.1</b>	<b>Oyster-gonadal-TGFβ-like</b>	<b>0</b>	
AM856836	cdn21p0003d20.f.1.a.cg.1	WD repeat-containing protein 92	6E-117	Cluster II
CU684816	oypg09b05m11r1_m13rev.1.a.cg.1	Hexokinase type I	7E-9	
CU681474	oygd09b07d18r1_m13rev.1.a.cg.1	<b>Cytochrome c oxidase</b>	<b>2E-53</b>	
<b>CK172373</b>	<b>CK172373.1.a.cg.1</b>	<b>NA</b>		
AJ565557	AJ565557.1.a.cg.1	NA		
<b>CU681620</b>	<b>oygd09b07c21r1_m13rev.1.a.cg.1</b>	<b>Superoxide dismutase</b>	<b>2E-62</b>	
<b>FP091069</b>	<b>oyio10b01h21r1_m13r.1.a.cg.1</b>	<b>Dopamine receptor</b>	<b>4E-24</b>	
CX069266	oygd10b09a22r1_m13rev.1.a.cg.1	NA		
CX069255	CX069255.1.a.cg.1	NA		

## FIGURES

Figure 1:

*in situ* experiment mortality rates estimated for Resistant (black) and Sensitive (grey) oysters. The 4 sampling dates used for microarray analysis are underlined from date 1 : May, 9<sup>th</sup>, date 2 : May, 25<sup>th</sup>, date 3 : June, 6<sup>th</sup>, to date 4 : June, 20<sup>th</sup>. The other sampling dates were used to check the mortality rates of the studied oysters. The red box indicates the mortality peak.

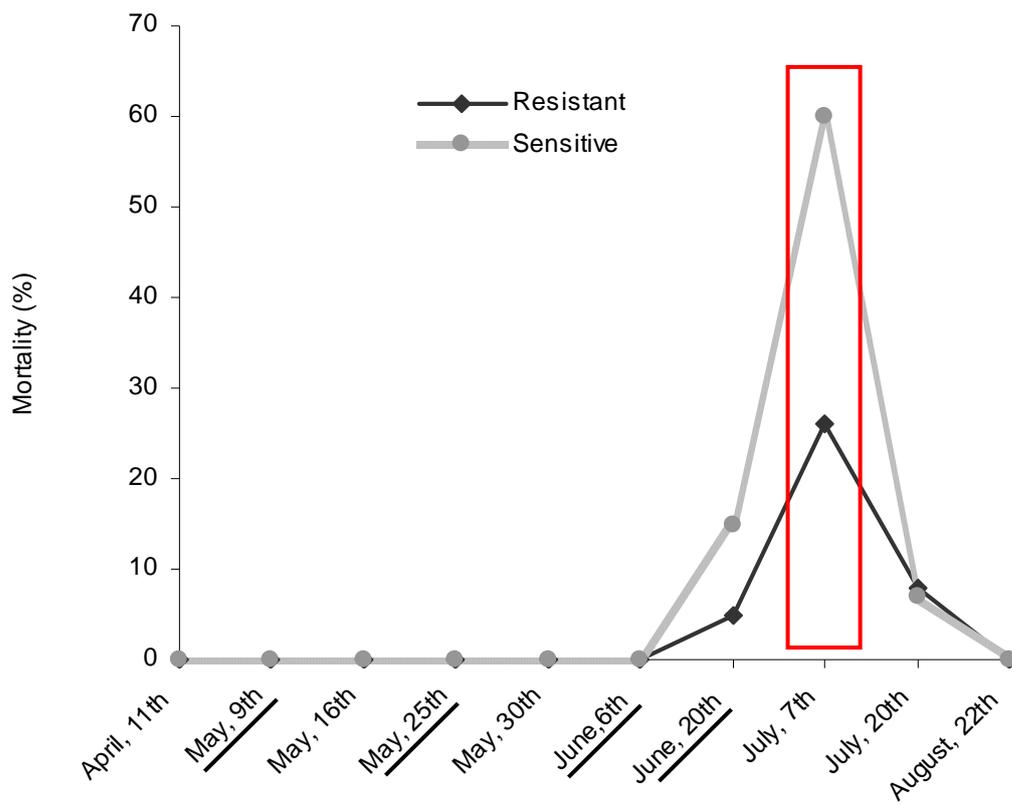


Figure 2:

Gene expression analysis of variance with GeneANOVA software (Didier *et al.*, 2002) of the 9,058 studied ESTs.

In this bidimensional visualization, each gene is plotted as a point, the abscissa being the variation due to the factor “line” normalized by the total variation of the gene, and the ordinate the logarithm of the  $p$ -value. The blue area contains the selection of genes with large part of the variation of the “line” factor, with the lower  $p$ -value (*i.e.* with the high strength of evidence for differential expression).

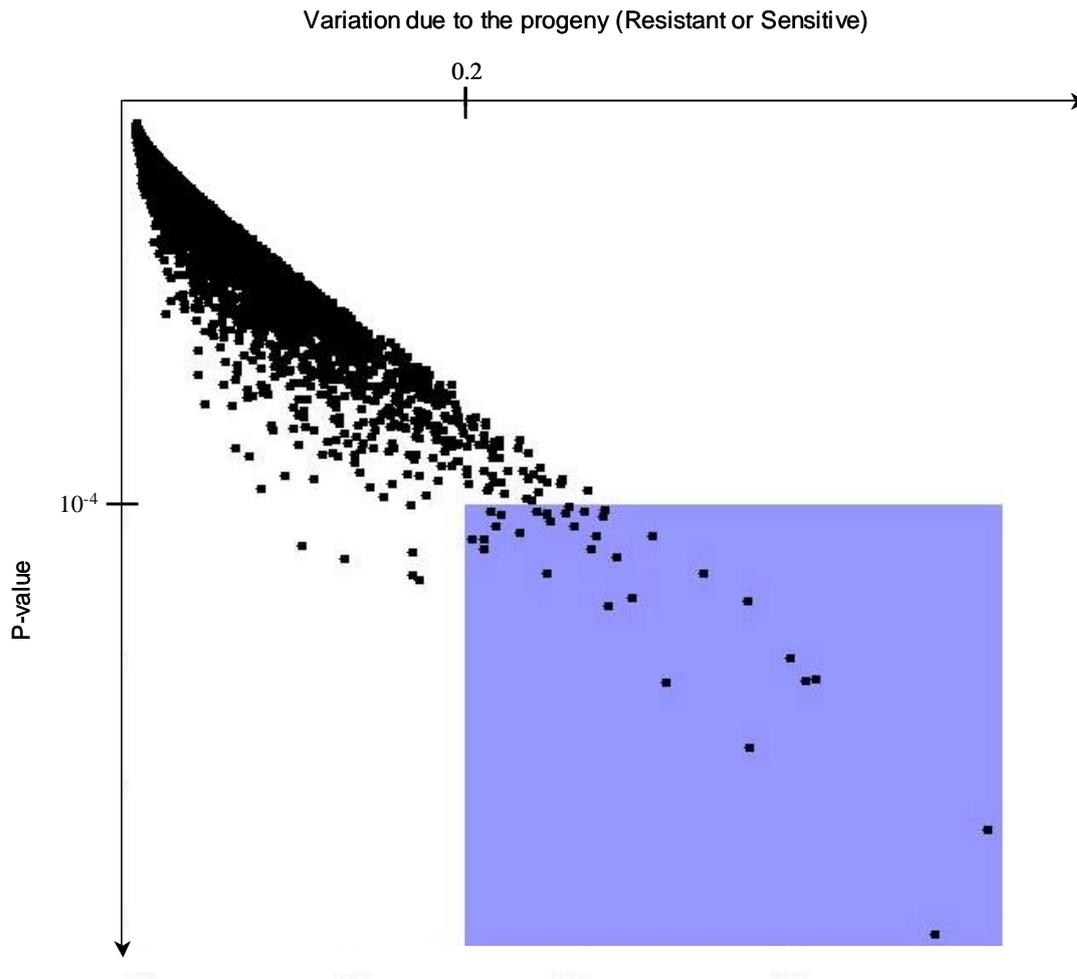


Figure 3:

Cluster analysis of the expression profiles of the genes selected through GeneANOVA (Didier *et al.*, 2002). Hierarchical clustering by average linkage was carried with Tmev software (<http://www.tm4.org/mev.html>). Columns correspond to the 4 dates of the *in situ* sampling for Resistant (R) and Sensitive (S) oyster lines and rows correspond to the selected genes. Color represents the corrected Cy5 log value obtained for R and S samples, for each date. The variations in transcript abundance are depicted by mean of a color scale, in which shades of red represent increase and shades of green represent decrease in transcript level. Thus, gene whose expression was under-expressed in R compare to S are found in cluster I, and gene over-expressed in R compare to S are found in cluster II. The dendrogram on the left represents correlation distances between the profiles of studied genes.

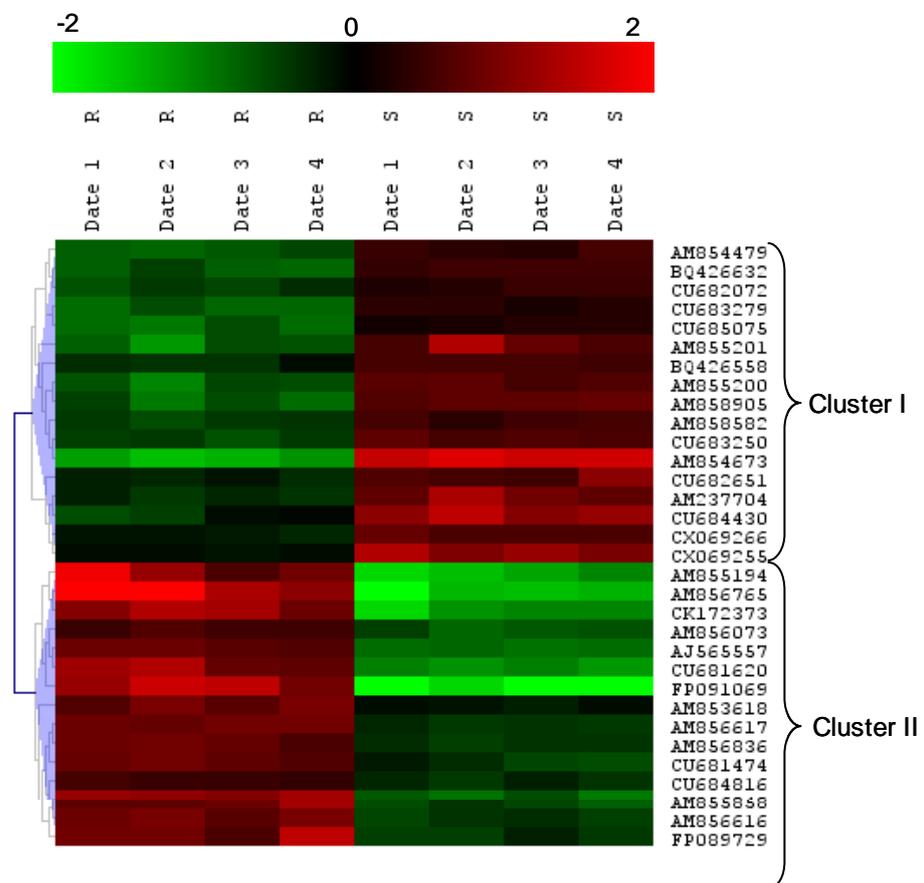
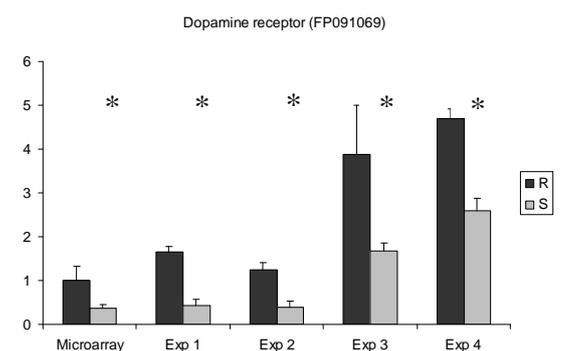
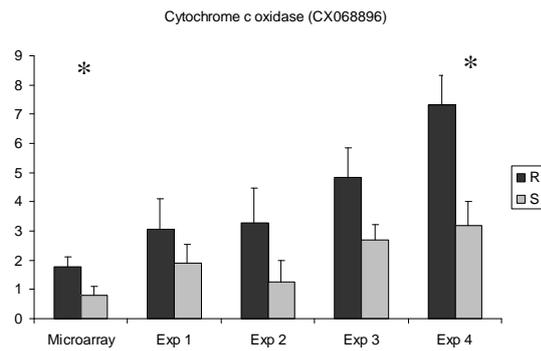
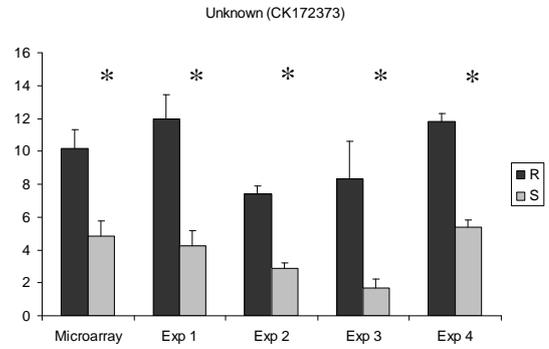
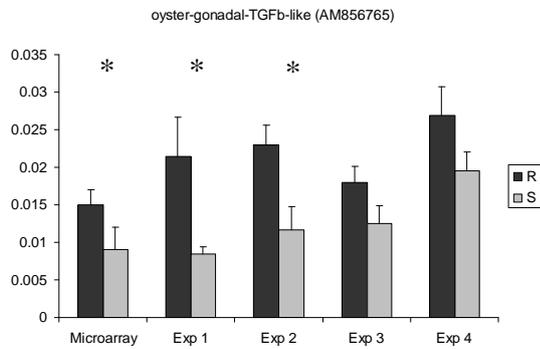
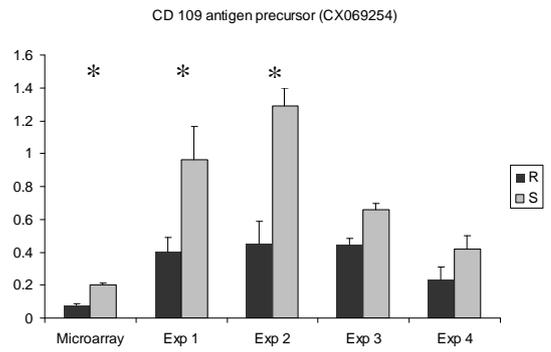
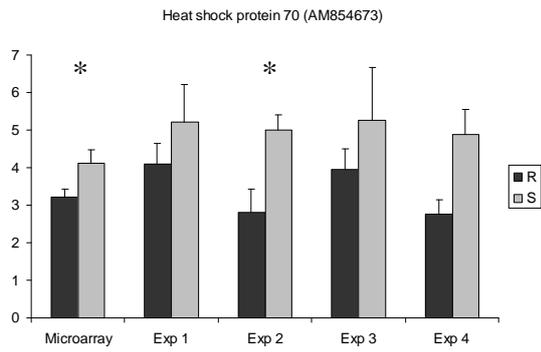


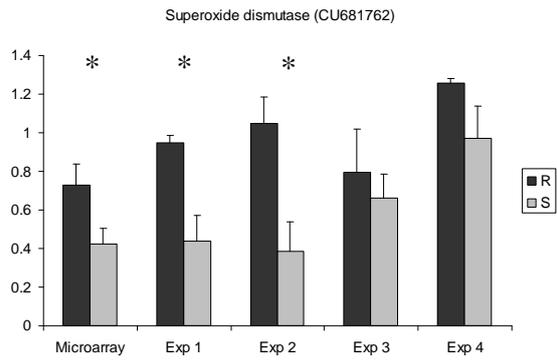
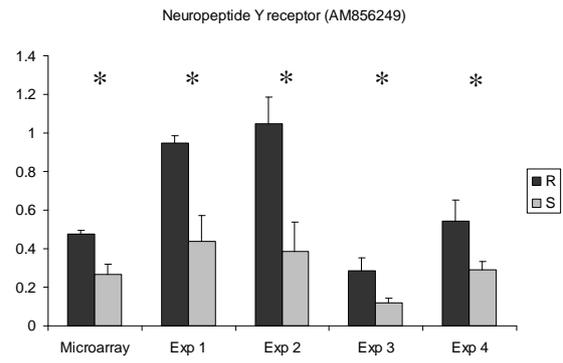
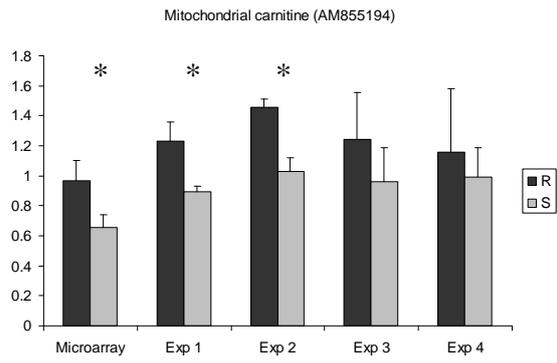
Figure 4:

mRNA levels estimated by real-time PCR of 9 selected genes for Resistant (R) and Sensitive (S) oysters relative to Elongation Factor I, sampled for :

- Microarray experiment (mean of mRNA levels obtained through the 4 analyzed dates, for R and S lines respectively)
- Exp 1: spat oysters, 4 month-old, second generation, nursery (mortality rates: 74% for S, 4% for R).
- Exp 2: spat oysters, 4 month-old, third generation, nursery (mortality rates: 80% for S, 30% for R).
- Exp 3: adult oysters, 16 month-old, second generation, South Brittany field (mortality rates: 14% for S, 5% for R).
- Exp 4: adult oysters, 16 month-old, second generation, Normandy field (mortality rates: 8% for S, 5% for R).

R samples are represented in black, and S samples are represented in grey. The asterix indicates significant differences of mRNA level between R and S at  $p < 0.05$ . Bars represent standard deviation.





---

**Troisième chapitre :**  
**Analyses physiologiques d'un**  
**gène candidat : le gène**  
***oyster-TGF $\beta$ -like***

---



# 1. Présentation générale et résumé de l'article

Dans ce chapitre, sont détaillées les premières études spatio-temporelles réalisées sur l'un des candidats identifié pour son différentiel entre les lignées R et S lors de l'analyse microarray décrite dans le chapitre précédent : le gène *oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like* (*og-TGF $\beta$ -like*). Les études d'annotation de ce candidat montrent qu'il appartient à la super-famille des Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) comprenant de nombreux facteurs impliqués dans différents processus physiologiques. Plus précisément, il existe plusieurs TGF $\beta$  impliqués dans la reproduction, et le candidat ici identifié semble se rapprocher de certains d'entre eux. C'est donc de par de son différentiel entre les huîtres R et S, et son implication potentielle dans la reproduction (suspectée jouer un rôle dans l'interaction conduisant aux mortalités, cf chapitre Introduction 2.3) que nous avons choisi de l'étudier plus en détail.

Dans ce chapitre, des généralités concernant la super-famille des TGF $\beta$  seront exposées, puis les résultats propres aux analyses spatio-temporelles de ce candidat seront détaillés afin d'avancer dans la compréhension de son fonctionnement chez l'huître.

## 1.1 La superfamille des TGF $\beta$

Depuis leurs découvertes au début des années 1980, les TGF $\beta$  sont apparus comme des facteurs de croissance impliqués dans des processus physiologiques essentiels tels que le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la différenciation et le contrôle de la croissance cellulaire, notamment au niveau des cellules germinales impliquées dans la reproduction (Javelaud & Mauviel, 2004).

La super-famille des TGF $\beta$  comprend plus de 30 protéines chez les mammifères, regroupés en sous-groupes représentés par les molécules TGF $\beta$ , les activines / inhibines, les Bone Morphogenic Protein (BMPs), les Growth and Differentiation Factors (GDFs) ou encore les hormones anti-müllérienne (AMH) (Chang *et al.*, 2002a).

Ces facteurs sont des cytokines, secrétées sous forme de dimères (homo ou hétérodimères) liés par des ponts disulfures. Les membres de cette famille sont généralement synthétisés sous forme de précurseurs contenant un peptide signal hydrophobe, un pro-domaine de taille variable contenant des sites potentiels de N-glycosilation et un domaine C-

terminal, correspondant au domaine mature (Figure 43). Ces pro-protéines sont clivées au niveau d'un domaine RXXR par des pro-protéines convertases permettant la libération du domaine C-terminal actif. Les protéines convertases représentent une famille de sept sérines endoprotéases, incluant par exemple la furine, qui coupe après un motif de type R-X-R/K-R (Cui *et al.*, 1998). Cette protéine est d'ailleurs décrite comme impliquée dans le processus de clivage du pro-domaine du précurseur du TGF $\beta$ -1 (Dubois *et al.*, 1995), de l'activine (Roebroek *et al.*, 1993), de l'AMH (Nachtigal & Ingraham, 1996) ou encore du BMP-4 (Cui *et al.*, 1998).

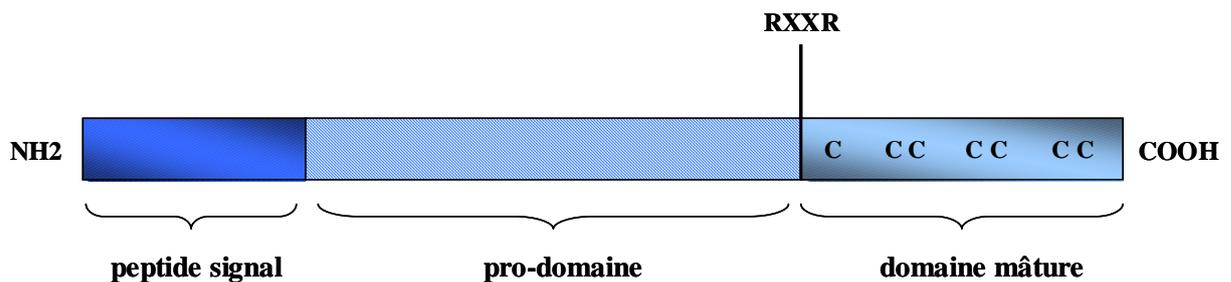


Figure 43 : Représentation schématique des TGF $\beta$ , secrétés sous forme de précurseurs, contenant un peptide signal hydrophobe et un site de coupure RXXR permettant la libération du domaine mûre après clivage.

Le rôle de ce pro-domaine est encore mal défini. Il semble toutefois impliqué dans la stabilité de l'hormone ainsi que dans sa spécificité, et il est nécessaire à la formation du dimère (Gray & Mason, 1990). La plupart des domaines matures sont assez bien conservés entre les sous-groupes, alors qu'une plus grande variabilité est observée entre les pro-domaines.

Le domaine mature des membres de la super-famille des TGF $\beta$  présente une structure caractéristique en nœud cystéine (Figure 44). Six des sept cystéines présentes dans le domaine mature forment des ponts disulfures deux à deux. La 7<sup>ème</sup> cystéine, située en amont de la 4<sup>ème</sup>, est impliquée dans la formation du dimère (Vitt *et al.*, 2001a). Cependant, il existe des exceptions, telles que pour les membres BMP15 ou GDF9 de cette famille, où la 4<sup>ème</sup> cystéine est remplacée par une sérine (McPherron & Lee, 1993), suggérant un autre type de liaison pour la dimérisation de ces molécules. Un autre exemple est celui du Gonadal-Soma-derived growth factor (GSDF) où la 7<sup>ème</sup> cystéine est manquante (Sawatari *et al.*, 2007).

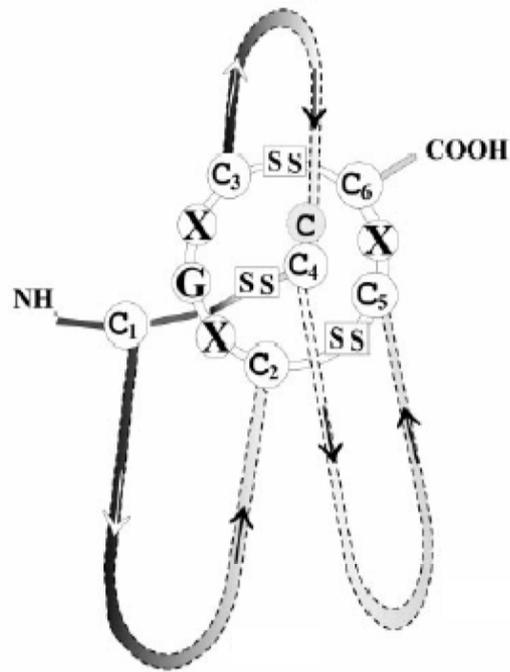


Figure 44 : Structure schématique des protéines des membres de la famille des TGFβ.

Les membres de la famille des TGFβ vont lier deux types de récepteurs à activité sérine thréonine kinase : des récepteurs de type I et de type II. Les études portant sur les récepteurs de type II montrent qu'ils sont en général constitutivement actifs, et que leur phosphorylation n'est pas régulée par la liaison du ligand (Wrana *et al.*, 1994). Lorsque les molécules TGFβ ont lié ce récepteur de type II, le complexe ligand-récepteur va recruter un récepteur de type I. Ainsi, la liaison du ligand va entraîner la formation d'un complexe, composé de deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II. Il y a alors phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II, qui pourra recruter et activer les smads. Les smads sont des facteurs de croissance, qui, lorsqu'ils sont liés aux récepteurs de type I et II, permettent la transduction du signal. A l'état non activé, les smads existent sous forme de monomères dans le cytoplasme, le domaine N-terminal interagit alors avec le domaine C-terminal pour inhiber son activité. Après stimulation par les TGFβ, les smads peuvent réguler positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle des gènes cibles en recrutant des co-activateurs ou des co-répresseurs (Herpin *et al.*, 2004) (Figure 45).

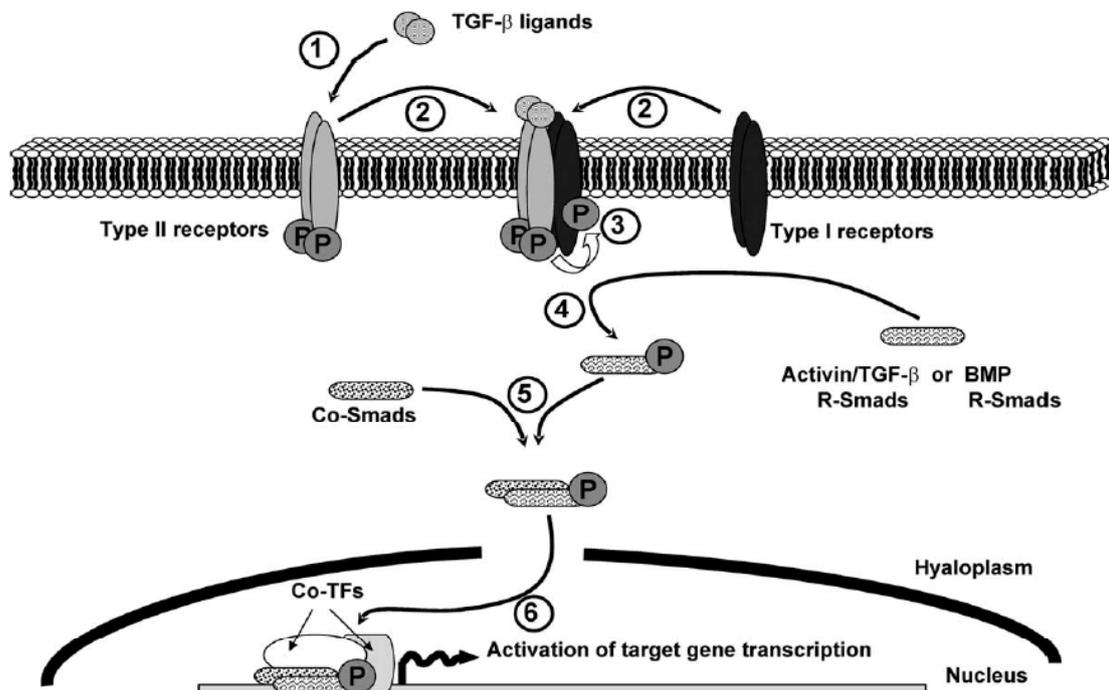


Figure 45 : Voies de signalisation associées à l'activation des TGF $\beta$ , d'après Herpin *et al.*, 2004.

- 1 : Interaction du ligand avec les récepteurs de type II phosphorylé.
- 2 : Formation d'un hétérotétramère par le recrutement des récepteurs de type I.
- 3 : Phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur type II.
- 4 : Recrutement et phosphorylation des récepteurs actifs associés aux Smads.
- 5 : Dimérisation avec les Co-smads.
- 6 : Transcription des gènes cibles par les Smads associés à des facteurs de transcription.

## 1.2 Les TGF $\beta$ impliqués dans la reproduction

De nombreuses publications scientifiques mettent en évidence les différents rôles que certains membres des TGF $\beta$  ont dans la reproduction (Ingman & Robertson, 2002). Par exemple, Josso & Di Clemente (1999) montrent que plusieurs membres de cette super-famille sont impliqués dans le développement gonadique, à savoir les TGF $\beta$  *sensu stricto*, les inhibines, les activines, les AMH ou encore le GDF-9 et le BMP-15. Ces différents membres peuvent en effet jouer un rôle stimulateur ou inhibiteur de la division, de la différenciation ou

encore de la maturation des cellules gonadiques (Josso & Di Clemente, 1999). On citera pour exemple le rôle des AMH, qui via les cellules auxiliaires entourant les cellules germinales (cellules de Sertoli et cellules de la granulosa) peuvent avoir des effets négatifs sur le développement des gonades, et ce, pour les deux sexes (Josso *et al.*, 1998 ; Josso & di Clemente, 1999). Un autre exemple est celui du TGF $\beta$  de type 1 intervenant dans le développement des testicules via l'inhibition de la stéroïdogénèse, en diminuant la production de la luteinizing hormone et en affectant les cellules interstitielles des cellules spermatogéniques (Gautier *et al.*, 1997 ; Wagener *et al.*, 2005). Il semblerait également que ce TGF $\beta$  de type 1 ait des effets sur la maturation des ovocytes via l'inhibition des gonadotropines (Kohli *et al.*, 2003). Plus récemment, des travaux ont montré que des bloqueurs de transcription, tels que l'actinomycine D, pouvaient réduire cet effet inhibiteur, suggérant que ce TGF $\beta$ -1 intervient au niveau transcriptionnel (Kohli *et al.*, 2005). Par ailleurs, des travaux réalisés sur les TGF $\beta$  de type 2 ont montré une augmentation du nombre de cellules germinales dans les ovaires de souris chez qui le gène avait été inactivé par « knockout » (Memon *et al.*, 2008).

Au niveau des BMPs, les différentes analyses montrent l'implication de plusieurs ligands BMP (type 2, 3, 4, 6, 7 et 15) dans la folliculogénèse ou encore dans la fertilité (Erickson & Shimasaki, 2003 ; Shimasaki *et al.*, 2003). Il semblerait ainsi que les BMPs, via les ligands, les récepteurs, les molécules de signalisation ou encore les protéines de liaison peuvent agir sur le fonctionnement du système reproducteur : ils pourraient ainsi contrôler de nombreux processus tels que la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose dans les tissus reproducteurs (Shimasaki *et al.*, 2004). Plus précisément, de nombreuses études ont montré que le BMP-15 et le GDF-9, deux membres très proches de la super-famille, peuvent influencer le quota ovulatoire chez le mouton (Galloway *et al.*, 2002), la souris et le rat (Hashimoto *et al.*, 2005 ; Otsuka & Shimasaki 2002) et chez l'humain (Moore *et al.*, 2004). Certaines de ces études, basées sur des sur-expressions de ces protéines, ou sur l'introduction de mutation dans ces gènes, semblent indiquer que ces facteurs ont parfois la capacité, via des interactions avec les cellules de la granulosa, de réduire le quota ovulatoire (Moore *et al.*, 2004). Plus récemment, un BMP type 15 a été étudié chez le poisson zèbre (Clelland *et al.*, 2006). La protéine correspondante a été détectée à la fois dans les ovocytes et les cellules folliculaires du poisson, et l'utilisation d'un antisérum anti-BMP15 a permis d'augmenter la maturation des ovocytes alors que l'incubation avec une protéine recombinante du BMP15 l'a réduite confirmant ainsi l'effet inhibiteur de ce BMP15 sur la

maturation des ovocytes. De plus, des injections *in vivo* d'un antisérum BMP15 chez cette espèce ont montré une baisse significative de la maturation des cellules folliculaires primaires, laissant supposer qu'il intervient également au niveau de la folliculogénèse (Peng *et al.*, 2008).

Enfin, de manière générale, plusieurs études ont mis en évidence les liens étroits existant entre les facteurs exprimés au sein des cellules germinales et les facteurs associés aux cellules auxiliaires de ces cellules germinales, aussi bien chez la femelle (Figure 46) que chez le mâle (Figure 47). Il semble en effet que les développements des cellules germinales et des cellules somatiques soient étroitement liés par des signaux endocrines / paracrines. Par exemple, des études ont mis en évidence des systèmes de rétroaction (feedback) négatifs entre les ovocytes et les cellules folliculaires via l'expression du BMP15 et du facteur « kit ligand » (stem cell factor) : le BMP15 stimule l'expression du facteur « kit ligand » dans les cellules de la granulosa, alors que le kit ligand inhibe l'expression du BMP15 dans les ovocytes (Otsuka & Shimasaki 2002).

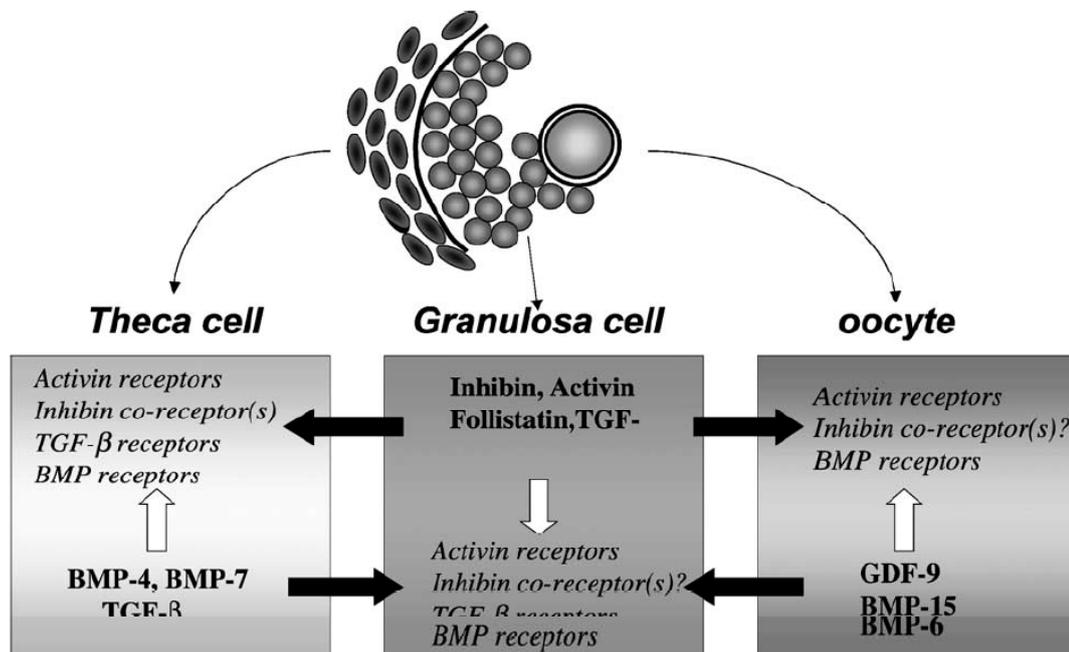


Figure 46 : Les différents membres appartenant à la super-famille des TGFβ et les récepteurs associés exprimés dans les ovocytes et dans les cellules somatiques (cellules de la granulosa et cellules de la thèque). Les flèches noires représentent les régulations paracrines, et les flèches blanches les régulations endocrines. D'après Knight & Glister, 2003.

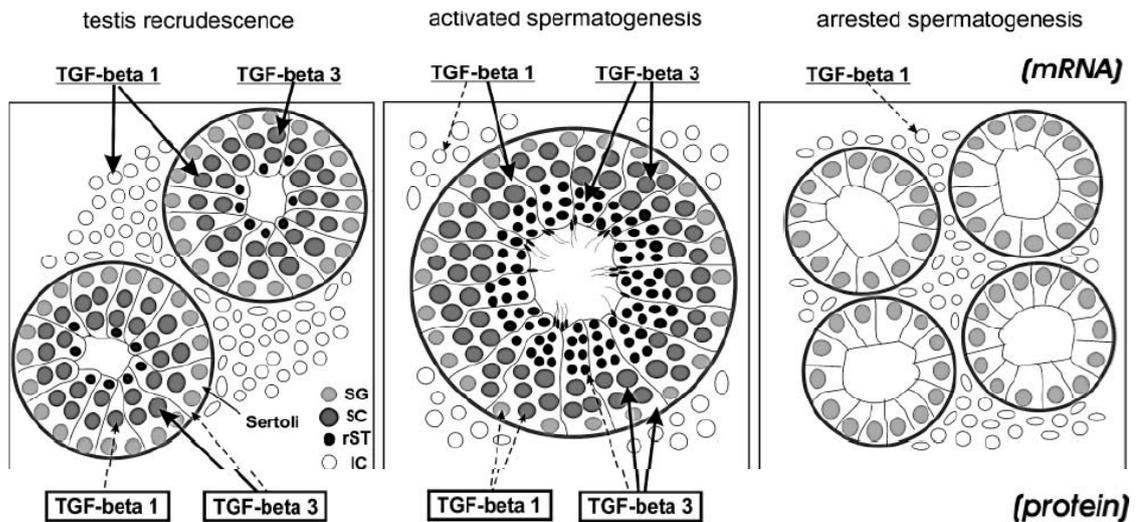


Figure 47 : Schéma représentant les variations d'expression des membres TGF $\beta$ -1 et TGF $\beta$ -3 dans les différentes cellules du testicule comprenant : SG : spermatogonies, SC : spermatocytes, rST : spermatides, IC : cellules interstitielles. D'après Wagener *et al.*, 2005.

### 1.3 L'identification d'un nouveau membre de la super-famille des TGF $\beta$ chez *C. gigas*

Chez l'huître *C. gigas*, quelques ligands de la super-famille des TGF $\beta$  ont déjà été analysés. En effet, Lelong *et al.* (2000) ont identifié un gène nommé *mGDF* orthologue des BMP-2, potentiellement impliqué dans la métamorphose. Les gènes nommés *Cg-Dorsaline* et *Cg-Gbb* orthologues respectifs de BMP-10 et BMP-5-7 ont également été caractérisés (Herpin *et al.*, 2004). Enfin, il existe un gène nommé *Cg-TGF $\beta$*  orthologue des activines, qui semble impliqué dans les réponses immunitaires de *C. gigas* (Lelong *et al.*, 2007). Nous présentons ici un nouveau ligand de cette super-famille, le gène *og-TGF $\beta$ -like*.

Différentes analyses de comparaison transcriptomique ont permis d'identifier cette EST appartenant à la super-famille des TGF $\beta$  comme différentiellement exprimée entre les lignées R et S. En effet, Huvet *et al.* (2004), via des analyses d'hybridation soustractive (SSH) réalisées entre des huîtres R et S, ont pour la première fois identifié ce candidat (GenBank :

CK172353), comme étant différentiellement exprimé entre les deux souches. Les analyses transcriptomiques via les puces à ADN présentées dans le chapitre précédent ont également permis de sélectionner ce candidat comme marqueur potentiel des différences entre les huîtres R et S. Enfin, des analyses réalisées à partir de prélèvements R et S issus de quatre conditions différentes ont permis de confirmer à nouveau le différentiel entre les deux lignées lorsque des mortalités significatives dans le milieu sont observées.

Nous avons donc débuté l'exploration du fonctionnement de ce gène via des analyses de séquences et des analyses d'expression spatio-temporelles. En effet, les connaissances des patterns d'expression spatio-temporelle et/ou en réponse à des stimulus extérieurs représentent des informations importantes pour l'assignation d'une fonction à un gène donné. Ces études nous permettront donc d'avancer dans la compréhension de son rôle au sein de l'huître, pour, à terme, comprendre son implication potentielle dans l'apparition des mortalités estivales.

### 1.3.1 Les analyses de séquence

L'obtention de la séquence complète du gène *og-TGF $\beta$ -like* (Figure 48) a été réalisée grâce au contiguage d'une EST identifiée lors du séquençage réalisé via le Marine Genomics Europe (Tanguy *et al.*, 2008), de l'EST issue des banques soustractives réalisées par Huvet *et al.* (2004), et par l'extension du côté 5' par screening d'une banque de bord de manteau (Lelong *et al.*, 2000). La séquence ainsi contiguée a été validée par le séquençage du produit PCR obtenu à partir de primers dessinés à chaque extrémité de la séquence.



7<sup>ème</sup> cystéine a déjà été observée chez certains TGF $\beta$  tels que le GSDF identifié chez la truite arc-en-ciel (Sawatari *et al.*, 2007).

Enfin, les études de Blast, d'alignement de séquences et les études phylogénétiques réalisées sur le domaine mature du gène *og-TGF $\beta$ -like* montrent que ce gène ne présente que très peu d'homologies avec les autres TGF $\beta$  préalablement identifiés (incluant les TGF $\beta$  préalablement identifiés chez l'huître, Lelong *et al.*, 2000 ; Herpin *et al.*, 2004 ; Lelong *et al.*, 2007). Il semblerait donc que *og-TGF $\beta$ -like* soit un nouveau membre dérivé de cette super-famille.

### 1.3.2 Les analyses d'expression spatio-temporelles

Les analyses d'expression de *og-TGF $\beta$ -like* par PCR en temps réel réalisées sur tous les tissus de l'huître ont montré qu'il est exclusivement exprimé dans la gonade, les taux d'expression relevés dans les autres tissus étant négligeables (Figure 49).

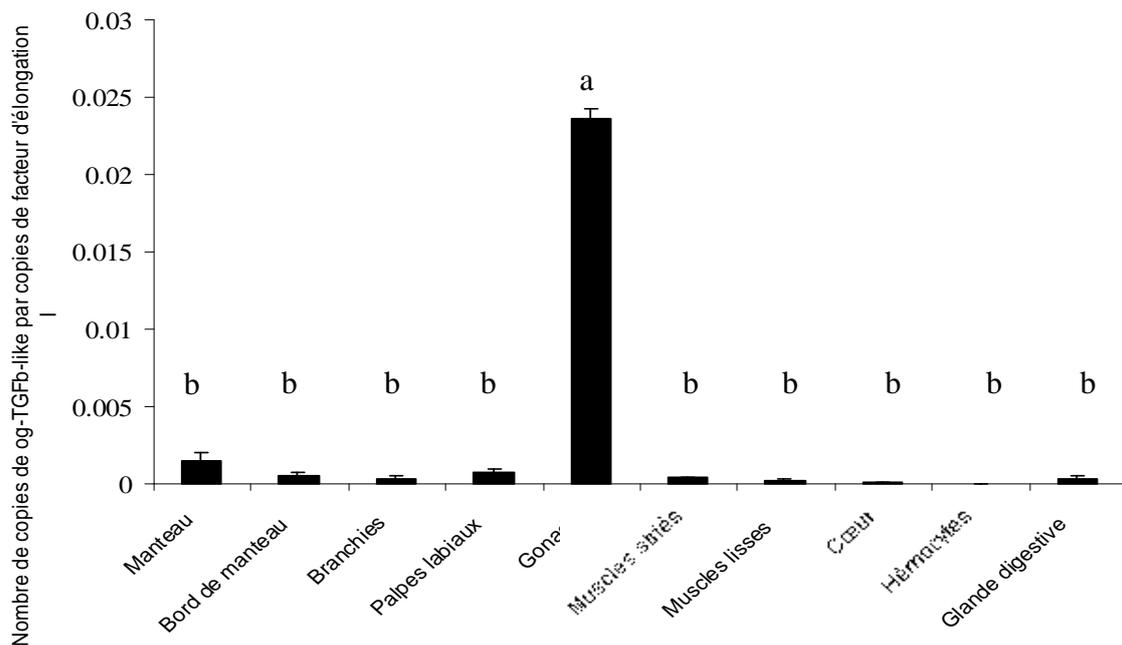


Figure 49 : Niveaux de transcrits de *og-TGF $\beta$ -like* relatifs au transcrits du gène facteur d'élongation I dans tous les tissus d'huîtres. Les différences significatives ( $p < 0.05$ ) sont indiquées par des lettres.

Des mesures du niveau d'expression de *og-TGF $\beta$ -like* dans la gonade durant un cycle entier de reproduction ont mis en évidence une augmentation continue des taux de transcrits durant le développement des tubules gonadiques, pour atteindre un maximum lorsque les huîtres sont matures (stade 3). Une forte diminution du niveau de transcrits est alors observée lorsque les cellules germinales sont expulsées (stade 4), diminution qui devient significative lorsqu'il n'y a plus que quelques cellules germinales résiduelles en cours de régression (stade 0'). Enfin, aucune différence d'expression significative n'a été observée entre les deux sexes (Figure 50).

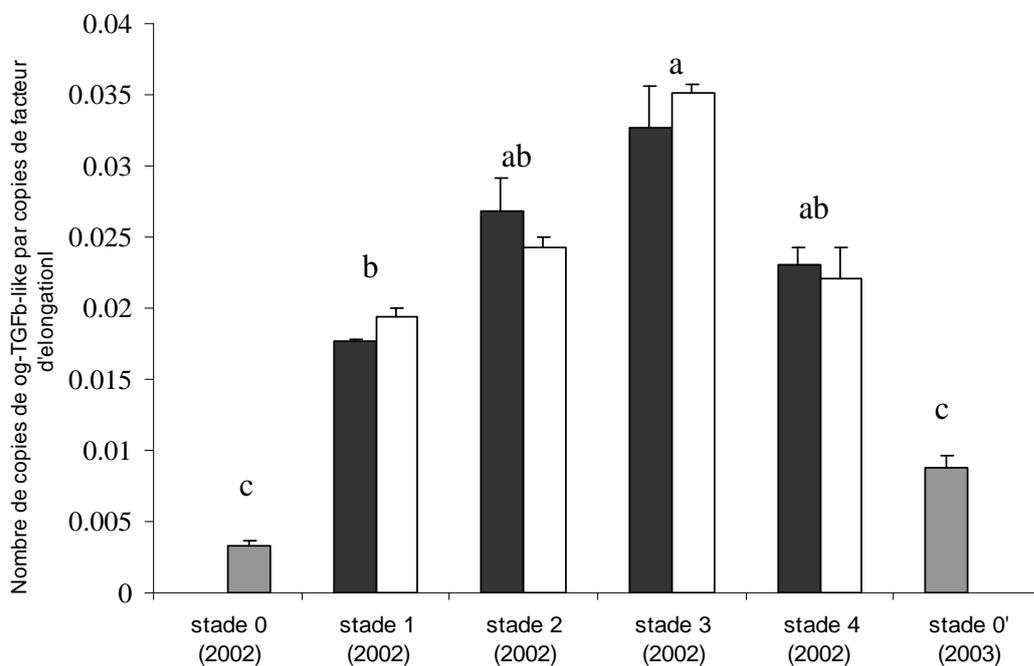


Figure 50 : Niveaux de transcrits de *og-TGF $\beta$ -like* relatifs au transcrits du gène facteur d'élongation I durant un cycle complet de reproduction de *C. gigas*. Les barres noires représentent les femelles et les blanches, les mâles. Les différences significatives ( $p < 0.05$ ) sont indiquées par des lettres. Stade 0 : prolifération cellules souches, Stade 1 : mitoses goniales, Stade 2 : méiose, maturation cellules germinales, Stade 3 : maturité, Stade 4 : émission des gamètes – régression.

Les analyses par hybridation *in situ* (HIS) de sondes spécifiques du gène *og-TGFβ-like* sur des huîtres matures ont mis en évidence que ce gène s'exprime exclusivement dans les cellules environnantes des cellules germinales (ovocytes chez la femelle : Figure 51 et spermatocytes chez le mâle : Figure 52), alors que les cellules germinales elles-mêmes ne sont pas marquées.

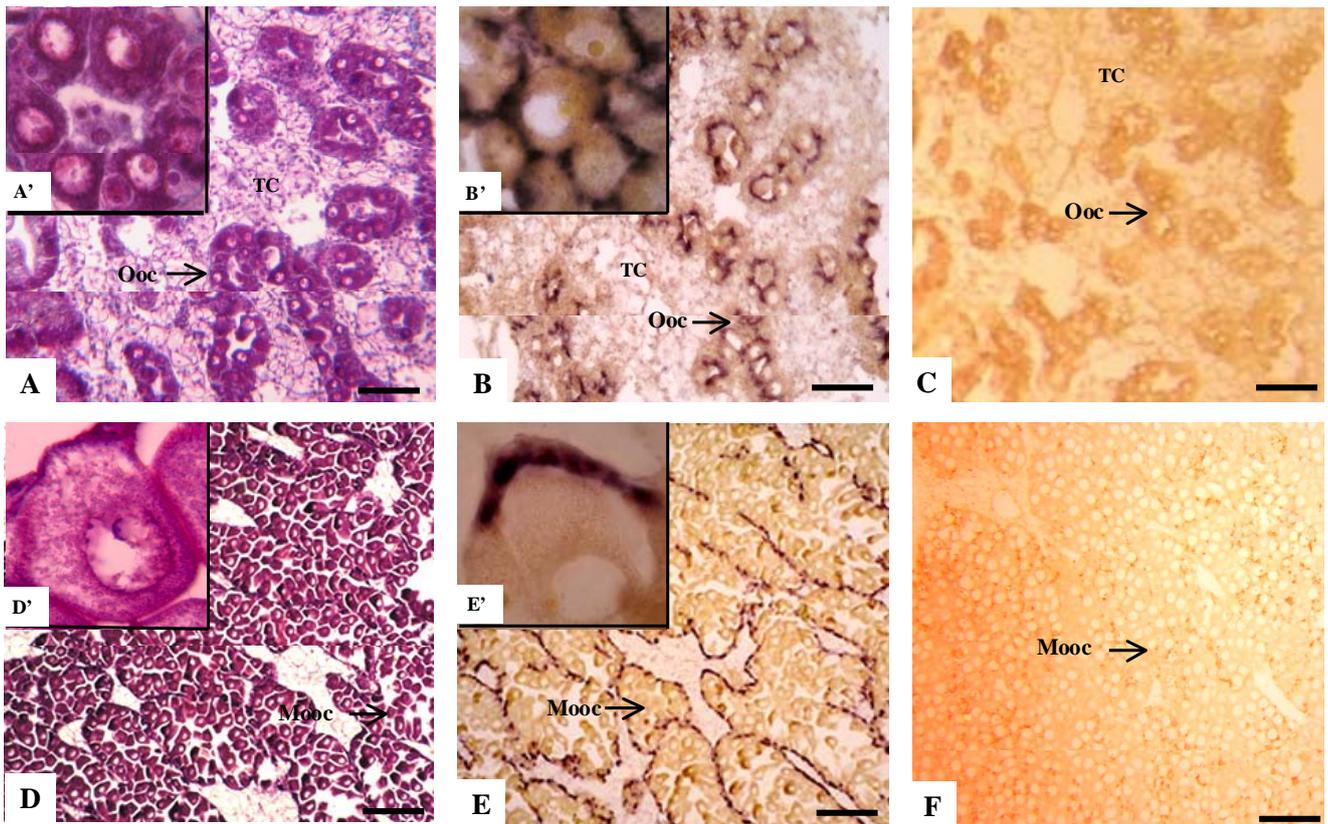


Figure 51 : Analyse histologique et localisation de l'expression de *og-TGFβ-like* par HIS dans des gonades femelles de *C. gigas* de stade 2 (A) et de stade 3 (D).

B, B', E, E' : Marquage de la sonde spécifique de *og-TGFβ-like* avec la sonde anti-sens (cellules marquées en bleu foncé).

C, F : Contrôles négatifs avec la sonde sens.

TC : tissu conjonctif, Ooc : ovocytes, Mooc : ovocytes mûres

Echelle : 15µm.

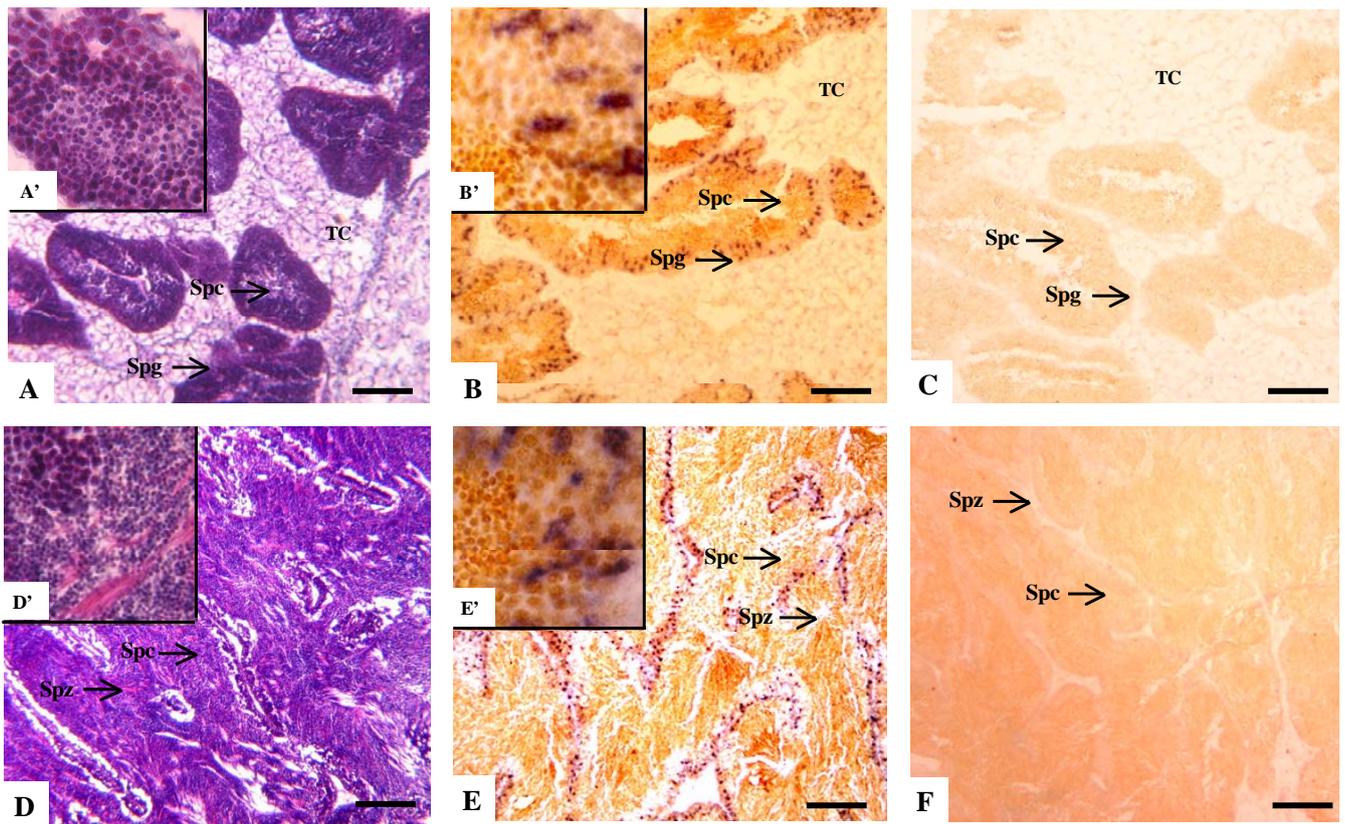


Figure 52 : Analyse histologique et localisation de l'expression de *og-TGFβ-like* par HIS dans des gonades mâles de *C. gigas* de stade 2 (A) et de stade 3 (D).

B, B', E, E' : Marquage de la sonde spécifique de *og-TGFβ-like* avec la sonde anti-sens (cellules marquées en bleu foncé).

C, F : Contrôles négatifs avec la sonde sens.

TC : tissu conjonctif, Spg : spermatogonies, Spc : spermatocytes, Spz : spermatozoïdes

Echelle : 15 μm.

Ces cellules somatiques entourant les cellules germinales pourraient correspondre aux cellules auxiliaires des cellules germinales. Cependant, ces cellules sont encore peu étudiées chez *C. gigas*, et leur rôle précis vis-vis des cellules germinales reste toujours inconnu, malgré de récentes études réalisées chez le mâle (Franco *et al.*, 2008) permettant de confirmer leur existence par microscopie électronique. D'autres analyses de ces cellules somatiques chez les invertébrés, parfois qualifiées de « cellules folliculaires » chez les femelles (Eckelbarger & Young, 1999) ou de « cellules de Sertoli » chez les mâles (Erkan & Souza, 2002), ont mis en évidence des interactions directes avec les cellules germinales. De plus, certains membres de la super-famille des TGFβ interviennent dans le développement des cellules germinales,

comme cela a été démontré chez la drosophile (Schulz *et al.*, 2004) ou encore chez la truite, le gène GSDF identifié dans les cellules somatiques ayant un rôle sur la prolifération des spermatogonies et probablement sur la maturation des ovocytes (Sawatari *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats laisse donc supposer que *og-TGF $\beta$ -like* pourrait avoir un rôle régulateur de la différenciation et/ou de la maturation des cellules germinales.

L'identification de ce gène impliqué dans la reproduction et différenciellement exprimé entre les huîtres R et S est donc particulièrement intéressante. En effet, des différences de stratégies de reproduction ont souvent été observées entre ces deux lignées : les huîtres R investissant moins dans la reproduction que les huîtres S, auraient alors de meilleures capacités à survivre aux mortalités estivales (Samain *et al.*, 2007). Dans ce cas, la sur-expression de *og-TGF $\beta$ -like* chez les huîtres R pourrait être associée à un effet inhibiteur du développement de la gonade, comme cela a d'ailleurs été déjà observé pour certains TGF $\beta$ , tels que le TGF $\beta$ 1 (Kohli *et al.*, 2005), les AMH (Josso *et al.*, 1998), ou encore les BMP15 dans certains cas (Moore *et al.*, 2004) (*cf.* partie 1.2). Cependant, d'autres analyses fonctionnelles seront nécessaires pour confirmer ces hypothèses et tester si *og-TGF $\beta$ -like* est réellement un acteur déterminant dans l'apparition des mortalités. Cela pourra également permettre de tester, à terme, si l'investissement reproducteur peut réellement être un facteur influençant l'apparition des mortalités.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication scientifique publiée dans le journal GENE, présentée ci- après.

## **2. Article n°3**

# Characterization of a gonad-specific transforming growth factor- $\beta$ superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*

Elodie Fleury<sup>a,b</sup>, Caroline Fabioux<sup>a,b</sup>, Christophe Lelong<sup>b</sup>, Pascal Favrel<sup>b</sup>, Arnaud Huvet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Ifremer, UMR M100 PE2M, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France

<sup>b</sup> Université de Caen, UMR M100 PE2M, 14032 Caen Cedex, France

Received 20 September 2007; received in revised form 11 December 2007; accepted 12 December 2007

Available online 2 January 2008

## Abstract

Through differential screening between oyster families selected for high and low summer survival, we have characterized a new transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily member. This novel factor, named *oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like* (*og-TGF $\beta$ -like*), is synthesized as a 307 amino acid precursor and displays 6 of the 7 characteristic cysteine residues of the C-terminal, mature peptide. Sequence comparison revealed that *og-TGF $\beta$ -like* has a low percentage of identity with other known TGF- $\beta$  superfamily members, suggesting that *og-TGF $\beta$ -like* is a derived member of this large superfamily. Real-time PCR (RT-PCR) analysis in different oyster tissues showed that *og-TGF $\beta$ -like* is specifically expressed in both male and female gonads, at distinct levels according to the reproductive stage. *Og-TGF $\beta$ -like* relative expression was the lowest at the initiation of the reproductive cycle and increased as maturation proceeded to achieve a maximal level in fully mature female and male oysters. *In situ* hybridisation demonstrated that expression was exclusively detected in the somatic cells surrounding oocytes and spermatocytes. The role of this newly-characterized TGF $\beta$  member in the reproduction of cupped oyster is discussed in regard to the specificity and the localization of its expression, which singularly contrasts with the pleiotropic roles in a variety of physiological processes commonly ascribed to most TGF- $\beta$  family members identified so far.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Bivalve mollusc; Transforming growth factor; Gene expression; Oyster; Reproduction

## 1. Introduction

Significant mortality has been reported in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, for many years (Cheney et al., 2000) and is a major concern of oyster farmers. Within the recently established, French national, multidisciplinary program “Mor-est”, set up to study the causes of summer mortality in *C. gigas*, divergent selection criteria based upon summer survival have been applied to produce resistant (R) and susceptible (S) oyster families (Dégremont, 2003; Dégremont et al., 2007). A previous

analysis of the molecular events underpinning the physiological differences between R and S families was undertaken using suppression-subtractive hybridisation (SSH). This study supported the characterization of 46 differentially-expressed cDNAs between R and S families (Huvet et al., 2004).

With the aim of elucidating the molecular bases of summer survival, the present study reports the screening, using nylon array, of the 46 oyster SSH cDNAs from R- and S-selected families. Among the few differentially expressed genes characterized between R and S samples, one encodes a Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -related (TGF $\beta$ ) protein. The TGF $\beta$  superfamily is a structurally conserved but functionally diverse group of widely distributed extracellular signalling proteins in metazoans (Herpin et al., 2004). On the basis of structural characteristics, members of this superfamily have been further classified into several subfamilies: the TGF $\beta$  *sensu stricto* subfamily, an extensive bone morphogenetic protein (BMP) subfamily, the growth and

**Abbreviations:** cDNA, complementary DNA; og-TGF $\beta$ -like, oyster-gonadal-Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -like; EST, expressed sequence tag; BMP, bone morphogenetic protein; SSH, suppression subtractive hybridization; DNase, deoxyribonuclease; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; ISH, in situ hybridization; UTR, untranslated region.

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 22 46 93; fax: +33 2 98 22 46 53.

E-mail address: [ahuvet@ifremer.fr](mailto:ahuvet@ifremer.fr) (A. Huvet).

differentiation factor (GDF) subfamily, the activin/inhibin subfamily, as well as several divergent factors (Knight and Glister, 2006). The TGF $\beta$  superfamily members interact with both type II and type I serine/threonine kinase-specific receptors, which transduce their signals *via* the activation of Smad nuclear effectors (ten Dijke et al., 1996).

Members of the TGF $\beta$  superfamily are critical growth factors regulating a variety of important processes, such as proliferation and differentiation of several types of cells (ten Dijke et al., 2000) or acting during development. Apart from a commonly pleiotropic role in several physiological processes, a few key components of the TGF $\beta$  system exhibit specific roles, such as members implicated in testis (Itman et al., 2006) or ovarian follicle development (Knight and Glister, 2006) throughout the reproductive system of animals (Shimasaki et al., 2004). The various components of TGF $\beta$  signalling appear well conserved during evolution, but the repertoire of ligands is much larger in vertebrates than in invertebrates. In *C. gigas*, four ligands, one BMP/activin type II receptor, three subfamily type I receptors as well as most Smad downstream transducers, have been isolated (Herpin et al., 2002; 2004; 2005a; 2005b; Lelong et al., 2000; 2001; 2007).

In the present paper, we report the characterization and the spatio-temporal expression of *oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like* (*og-TGF $\beta$ -like*), a TGF $\beta$  superfamily member specifically expressed in the gonad of the cupped oyster, *C. gigas*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Biological material

For cDNA macroarray and real time PCR analyses, G2 and G3 oyster families were bred in March 2002 and 2003, respectively, at the Ifremer hatchery (La Tremblade, France) according to divergent-selection criteria (Dégremont, 2003; Dégremont et al., 2007). These oysters were then cultured at the Ifremer nursery (Bouin, France) where they were sampled. The remaining of G2 oysters stocks was transferred to Auray (South Brittany) and Baie des Veys (Normandy) sounds for a 12 months *in situ* rearing, where G2 R and S were sampled. The gonad was dissected from each oyster, and pools of four gonads (3 pools R and 3 pools S per experiment) were prepared for total RNA extraction. For each experiment, the mortality peak was observed after the sampling (one or two weeks after). Four experiments are therefore available to generate expression profiles on R and S stocks: experiment (1) juvenile oysters, 4 month-old, G2, nursery; (2) juvenile oysters, 4 month-old, G3, nursery; (3) adult oysters, 16 month-old, G2, South Brittany field; (4) adult oysters, 16 month-old, G2, Normandy field.

For analysis of gene expression during embryonic and larval development, samples of various developmental stages, identified microscopically, were the same as those previously described in Fabioux et al. (2004a).

For analysis of gene expression in adult tissues, mantle, mantle-edge, gills, labial palps, gonad, striated muscle, smooth muscle, heart, haemocytes, and digestive gland were dissected from mature oysters and pools of 4 oysters (3 pools for each tissue) were prepared for total RNA extraction.

For analysis of gene expression during the reproductive cycle of *C. gigas*, samples were the same as those previously described in Fabioux et al. (2005). For each reproductive stage, gonads from 20 oysters were dissected for RNA extraction and histological analysis.

### 2.2. RNA and cDNA preparation

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Gibco BRL) at a concentration of 1 ml/50 mg of tissue. Samples were then treated with DNase I (1 U/ $\mu$ g total RNA, Sigma) to prevent DNA contamination. RNA concentrations were measured with a spectrophotometer at 260 nm using the conversion factor 1 OD=40  $\mu$ g/ml RNA, and RNA quality was checked by using the Bioanalyseur 2100 (Agilent). Reverse transcription (RT) was carried out as described in Huvet et al. (2003) using 2  $\mu$ g total RNA from each sample.

### 2.3. Full length cDNA sequence

The full length sequence of the *oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like* was obtained by overlapping three ESTs of *C. gigas*, one obtained from Marine Genomics Europe database (Tanguy et al., 2008), a SSH-EST (CK172353, Huvet et al., 2004), and the last corresponding to the 5' extension of the SSH-EST. This extension was made by screening a cDNA library constructed in  $\lambda$ -ZAP II from *C. gigas* mantle-edge mRNA (Lelong et al., 2000), using a specific primer (5'-GAC ATC ATC TAC ACC CAG TTC CTG TC-3') and T3 universal primer. The amplified fragment was sub-cloned into pCR2.1<sup>®</sup> TOPO plasmid (Invitrogen), and sequenced (Qbiogene).

The full-length cDNA was amplified by PCR using primers designed at 5' and 3' extremities upon the contig of these 3 ESTs (forward: 5'-CAC GTG TAC CGT CAC CCT AT-3'; reverse: 5'-TGC AGT GGT TAG AAG CAA GG-3') with 0.5 U of BD Advantage<sup>™</sup> 2 polymerase mix (BD TITANIUM Taq DNA Polymerase, a proofreading polymerase and the BD TaqStart Antibody, Clontech). The amplified fragment was sub-cloned and sequenced.

### 2.4. Macroarray analysis

From the 46 differentially-expressed clones (Huvet et al., 2004), inserts were amplified by PCR using universal M13 primers and checked by electrophoresis. After denaturation (5 min at 95 °C, one volume of 0.6 N NaOH), each PCR product was blotted onto Hybond-N+nylon membrane (Amersham) in duplicate using a Minifold I spot-Blot system, as well as oyster *actin* after PCR amplification. *Actin* was used as an internal control based upon its steady-state level of expression already tested between R and S families. Deionized water was blotted onto each nylon membrane as a negative control. DNA was cross-linked to the membrane at 70 °C for 2 h. A digoxigenin-labeled cDNA probe was synthesized from cDNA (10  $\mu$ g) for 2 h at 37 °C using the NonaPrimer kit (Qbiogene). The labelled probes were purified from unincorporated dNTPs using DNAprep resin. Membranes were prehybridized as described

in Huvet et al. (2004). Hybridization was performed in duplicate overnight at 65 °C in prehybridization buffer containing the denatured digoxigenin-labelled probe (20 ng/μl). After hybridization, membranes were washed, as described by Huvet et al. (2004). The detection steps were performed according to the manufacturer's instructions (Dig nucleic acid detection kit, Roche Molecular Biomedicals).

The signal intensity was quantified using Multi-analyst software (Biorad), with the background signal removed. The value obtained is the spot intensity, expressed as an OD value per pixel, and multiplied by the spot-surface area. Values from 4 spots (duplicated membranes with duplicate spots) were used to calculate a mean value for each blotted cDNA. Transcript abundance was arbitrarily considered differential between R and S families when pooled values varied by greater than twofold.

### 2.5. Real-time PCR analysis

The level of four SSH-ESTs transcript was investigated by real-time PCR in the R and S samples analysed by macroarray using specific primers: CK172362 (*oyster-gonadal-TGFβ-like*) forward: 5'-TTG GAC ATC AGG GAA ATT CTG-3', reverse: 5'-CCA AAC GAA ACG ACA GGA AC-3'; CK172358: forward: 5'-CAA GAG CTT GGA CTT TGG GTA-3', reverse: 5'-CAA AGA GCT ATG ACC GAG TGG-3' (Huvet et al., 2004); CK172357 forward: 5'-CTG AAT GCA AAG AAA GGT TGG-3', reverse: 5'-GAT CAT TGC ACA AAT CAC AGG-3'; CK172373 forward: 5'-ACA TCA GGT TTA CGG CGT TC-3' and reverse: 5'-TGC CCA CCA ATA ACA ATG C-3'. The level of *oyster-gonadal-TGFβ-like* transcript was also investigated by real-time PCR in oyster tissues and in gonad according to the reproductive cycle determined by histology using the same specific primers. Amplification of *elongation factor I (efl)* cDNA (Fabioux et al., 2004b) was performed to confirm the steady-state level of expression of a housekeeping gene, providing an internal control for gene expression.

The real-time PCR amplifications were carried out in triplicate as described in Huvet et al., (2004) with the iQ SYBR Green Supermix (Biorad) using an Icyler (Biorad). Each run included a positive cDNA control (one sample of the present experiment), negative controls (each total RNA sample with DNase I treatment), and blank controls (water) analysed for each primer pair. PCR efficiency (E) was determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA to ensure that E ranged from 95 to 100%. Relative expression of the target gene was calculated as  $2^{(Ct_{efl} - Ct_{og-TGF\beta-like})}$ , with the cycle threshold of both genes at the same threshold limit.

### 2.6. In situ hybridisation (ISH)

Histology already has been published on the same samples (Fabioux et al., 2005). ISH was performed using sense and antisense DNA probes complementary to *og-TGFβ-like* cDNA according to Montagnani et al. (2001). *Og-TGFβ-like* insert was amplified by PCR using specific primers (forward: 5'-ACA

CCC AGT TCC TGT CGT TT -3'; reverse: 5'-TGT GAT CCA GCA GAG AGA CA-3').

### 2.7. Statistical analyses

Comparison of the relative level of *og-TGFβ-like* mRNA between R and S families was performed by Student's *t*-test using STATGRAPHICS software. Multiple comparisons of the relative level of mRNA between tissues, reproductive stages and sexes were performed using one-way analysis of variance followed by multiple comparison test with the Tukey's HSD method using the same software.

## 3. Results

### 3.1. cDNA macroarray analysis

The cDNA macroarray was hybridised by R and S samples collected in 4 experiments [(1) juvenile oysters, 4 month-old, G2, nursery; (2) juvenile oysters, 4 month-old, G3, nursery; (3) adult oysters, 16 month-old, G2, South Brittany field; (4) adult oysters, 16 month-old, G2, Normandy field] to focus on the genetic component rather than the effect of age, generation, or environment. This analysis revealed that 27 clones (of the 46 spotted clones) varied greater than twofold between the R and S progenies, in at least one of the 4 sampled experiments. Among these 27 clones, 4 ESTs appeared two-fold higher in R than in S families in the two conditions displaying significant mortality (experiments 1 and 2). Indeed, percentages of mortality for R and S progenies were, respectively, 4% and 74% for 4 month-

Table 1

Relative mRNA level of 4 ESTs between selected oyster families resistant (R) and susceptible (S) to summer mortality

		Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4
Mortality rates		S: 74% R: 4%	S: 80% R: 30%	S: 14% R: 5%	S: 8% R: 5%
Accession number	Gene name	Fold change	Fold change	Fold change	Fold change
CK172362/ EF563990	<i>Oyster-gonadal TGFβ-like</i>	<u>2.22</u> (1.97) *	<u>2.75</u> (2.52) *	1.24 (1.20)	<u>2.04</u> (1.43)
CK172358	Unknown	<u>2.27</u> (1.99) *	<u>2.01</u> (1.51) *	1.52 (1.22)	<u>2.05</u> (1.59) *
CK172357	Unknown	<u>2.26</u> (2.18) *	<u>2.16</u> (1.76) *	1.84 (1.59) *	<u>2.48</u> (2.35) *
CK172373	Unknown	<u>2.28</u> (2.14) *	<u>2.10</u> (1.62) *	<u>2.18</u> (1.93) *	<u>2.02</u> (1.63) *
CK172378	<i>actin</i>	1.12 (1.02)	1.22 (1.00)	1.23 (1.03)	1.34 (1.05)

Expression profiles were generated by macroarray hybridized with R and S cDNA probes produced from 4 experiments and by real time PCR for the *oyster-gonadal-TGFβ-like* transcript. Underlined values: fold change varied greater than twofold in microarray ratio. Between brackets: real time PCR results, \*significant at the 5% level using Student's *t* test. Exp: experiment (1) juvenile oysters, 4 month-old, second generation, nursery; (2) juvenile oysters, 4 month-old, third generation, nursery; (3) adult oysters, 16 month-old, second generation, South Brittany field; (4) adult oysters, 16 month-old, second generation, Normandy field.



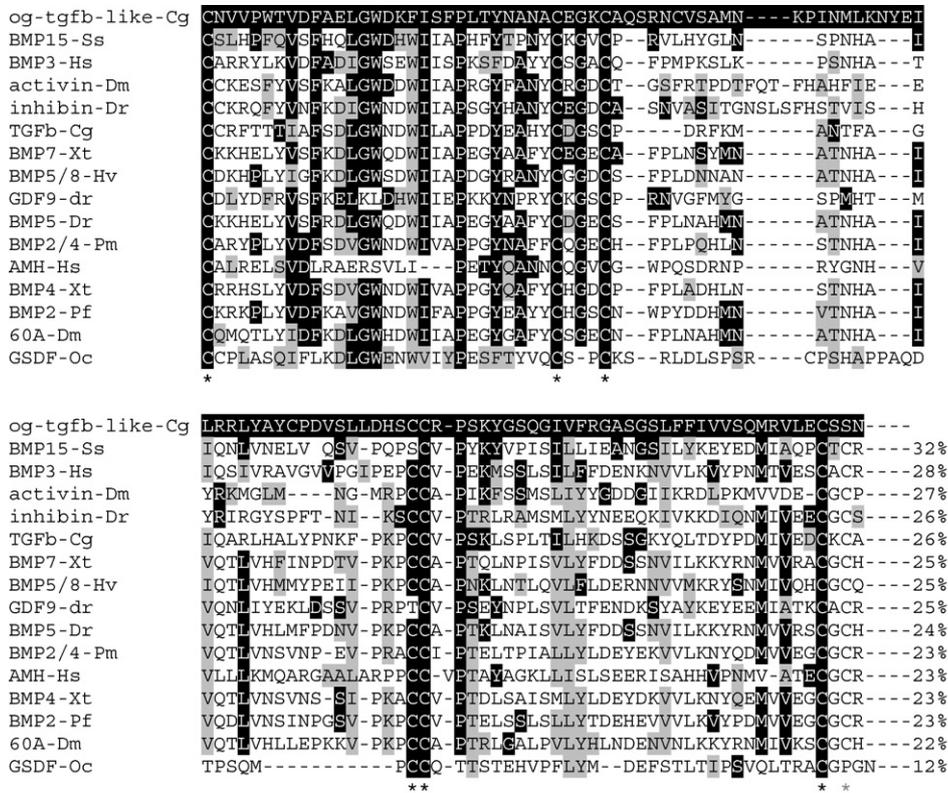


Fig. 2. Alignment of the deduced, amino-acid sequence and percentage identity of the *oyster-gonadal-TGFβ-like* with other sequences of TGFβ of different species. Alignment was generated from the first conserved cysteine residue by using CLUSTAL W. Amino acids identical between *oyster-gonadal-TGFβ-like* and other members are indicated in black and amino acids with similar physicochemical nature in grey. Asterisk indicates the 7 conserved cysteines for most of the TGFβ members (with the missing seventh cysteine in *og-TGFβ-like* in grey). Points denote gaps introduced to maximize the alignment. Percentage of identity was calculated using DNAMAN. Cg: *Crassostrea gigas*, Ss: *Sus scrofa*, Hs: *Homo sapiens*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Dr: *Danio rerio*, Xt: *Xenopus tropicalis*, Hv: *Hydra vulgaris*, Pm: *Petromyzon marinus*, Pf: *Pinctada fucata*, Oc : *Oncorhynchus mykiss*.

with a predicted signal peptide of 18 residues. It contains a consensus cleavage site (RFKR) in position 183-186, which is conserved among all TGFβ superfamily members: *og-TGFβ-like* precursor is likely cleaved by a furin convertase at this

typical proteolytic site to yield the C-terminal, mature peptide of 121 residues from position 187 to 307.

Alignment (Fig. 2) of mature Og-TGFβ-like with various TGFβ superfamily members shows that the sequence studied

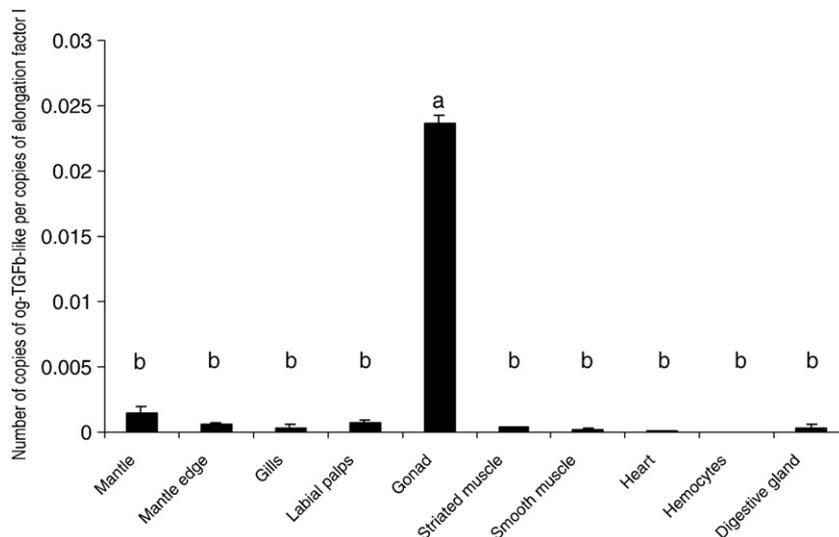


Fig. 3. Level of the *oyster-gonadal-TGFβ-like* transcript relative to *Elongation Factor I* transcript in tissues of wild mature *Crassostrea gigas* oysters analysed by real-time PCR. Bars represent standard deviation at 5% level. Significantly different means ( $p < 0.05$ ) are indicated by letters.

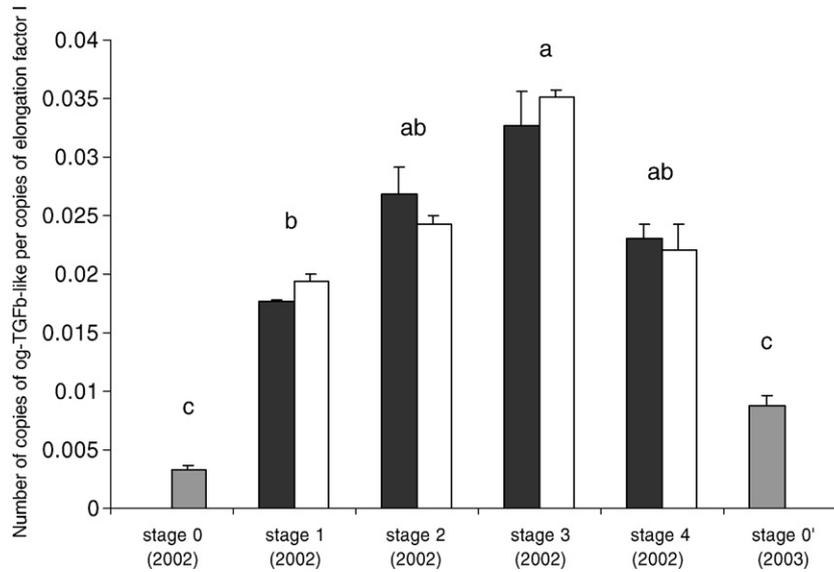


Fig. 4. Level of the *oyster-gonadal-TGFβ-like* transcript relative to *Elongation factor I* transcript analysed by real time PCR in male and female gonad during a complete annual reproductive cycle of *Crassostrea gigas*. Light grey bar: undifferentiated, dark grey bar: female, white bar: male. Stage 0: resting period, stage 1: initiation, stage 2: maturation, stage 3: ripeness, stage 4: post-spawning and stage 0': regression and next resting period. Bars represent standard deviation at 5% level. Significantly different means ( $p < 0.05$ ) are indicated by letters.

displays only 6 conserved cysteine residues and misses the seventh characteristic residue. The highest identity of Og-TGFβ-like mature region with other mature family ligands (Fig. 2) was observed with mammalian BMP 15 (32%).

### 3.3. Spatio temporal expression of the *oyster-gonadal-TGFβ-like*

The spatial expression pattern of *og-TGFβ-like* was analysed in 10 adult tissues (Fig. 3). A high relative level of transcript was

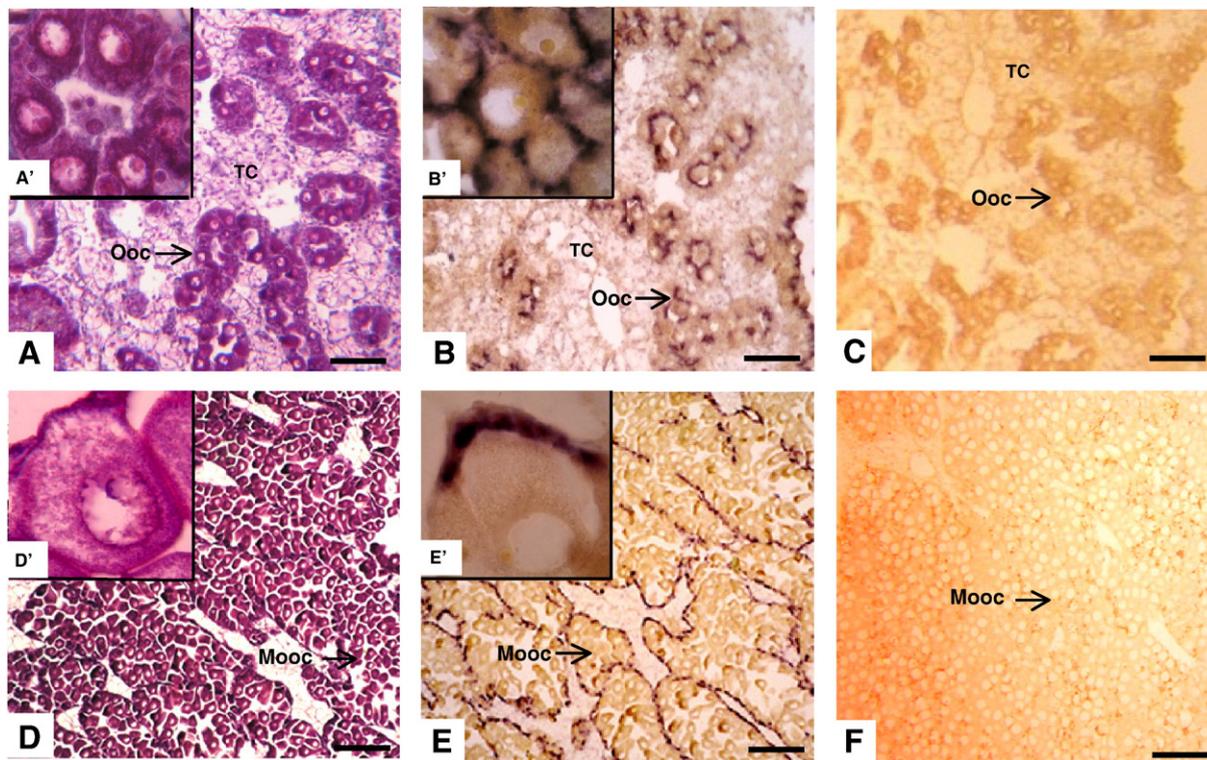


Fig. 5. Histological analysis and *oyster-gonadal-TGFβ-like* expression by ISH in female *Crassostrea gigas* gonad. A, D : Histological analysis. A : maturation step, D: end of the maturation step. B, C, E, F: The *oyster-gonadal-TGFβ-like* mRNA in female *C. gigas* gonad stained by *in situ* hybridization with an antisense probe. Positive cells are stained in dark blue. B: maturation step, C: negative control of the maturation step (sense probe), E: end of the maturation step, F: negative control of the maturation step (sense probe). TC: conjunctive tissue, Ooc: oocytes, Mooc: Mature oocytes. Scale bar: 15 μm; magnification: 200× for each panel, except for A', B', D' and E': 2000×.

detected in the gonad (mean relative expression  $\pm$  SD =  $0.028 \pm 0.001$ ); whereas, a weak or null signal was detected in the other tissues ( $0.0009 \pm 0.0004$ ). Relative transcript level detected in the gonad was approximately 30-fold higher than that observed in other tissues. The *elongation factor 1*, used as a positive control, did not reveal significant differences between tissues at the 5% level.

In the gonad, the relative *og-TGF $\beta$ -like* transcript increased approximately nine-fold from stage 0 (mean relative expression of both sexes  $\pm$  SD =  $0.0033 \pm 0.0002$ ), where only a few germinal stem cells are present, to stage 3 ( $0.029 \pm 0.00025$ ) when gonadic tubules are filled with mature spermatozoa or oocytes (Fig. 4). Then, this mRNA decreased approximately by 3.5 until the next stage 0 ( $0.0088 \pm 0.0012$ ), in which oysters are partially spent with some residual germ cells, or totally spent. No significant difference of expression between the two sexes was observed at the 5% level.

RT-PCR analysis from unfertilised oocytes to trochophore stage of *C. gigas* did not reveal any detectable level of *og-TGF $\beta$ -like* transcript. This assay was repeated twice, in which *elongation factor 1* mRNA level appeared at a standard level (data not shown).

#### 3.4. Localization of oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like mRNA by in situ hybridization (ISH)

As relative mRNA levels of *og-TGF $\beta$ -like* appeared the highest at stages 2 to 3 of gonad development (i.e. maturation

step), localization of expression was assayed by ISH during the maturation of germ cells. Stage and sex were determined by histological observations (Fig. 5 and 6, A, D).

At the beginning of the maturation step, the gonad of the female oyster contains tubule walls containing vitellogenic oocytes I, cells 30–45  $\mu$ m in diameter with large nuclei and coarsely-granular cytoplasm (Fig. 5A). Conjunctive connective tissue is abundant. A strong ISH signal, corresponding to antisense probe hybridization, was detected in cells located between the vitellogenic oocytes (Fig. 5B and B'); whereas, no hybridization was detected in the germinal cells nor in the somatic cells of other tissues (haemocytes, conjunctive, or digestive gland cells). Later in the maturation stage, female tubules are filled with mature oocytes, and connective tissue has almost disappeared. On the tubule walls, elongated cells, near oocytes appeared strongly-stained, and all tubule walls were also dark-blue stained, showing a strong *og-TGF $\beta$ -like* mRNA localization (Fig. 5D,E and E').

Concerning the male gonad, the beginning of the maturation step is characterized by tubules containing mainly stem cells, spermatogonia, and small, young spermatocytes (Fig. 6A), respectively, from the outer wall to the centre of the tubule. ISH signal was observed at the periphery of the tubule. A higher magnification accurately localised *og-TGF $\beta$ -like* mRNA signal in the space between spermatogonia (Fig. 6B and B'); whereas, no staining signal was observed in germinal cells (stem cells, spermatogonia and young spermatocytes). When oysters were

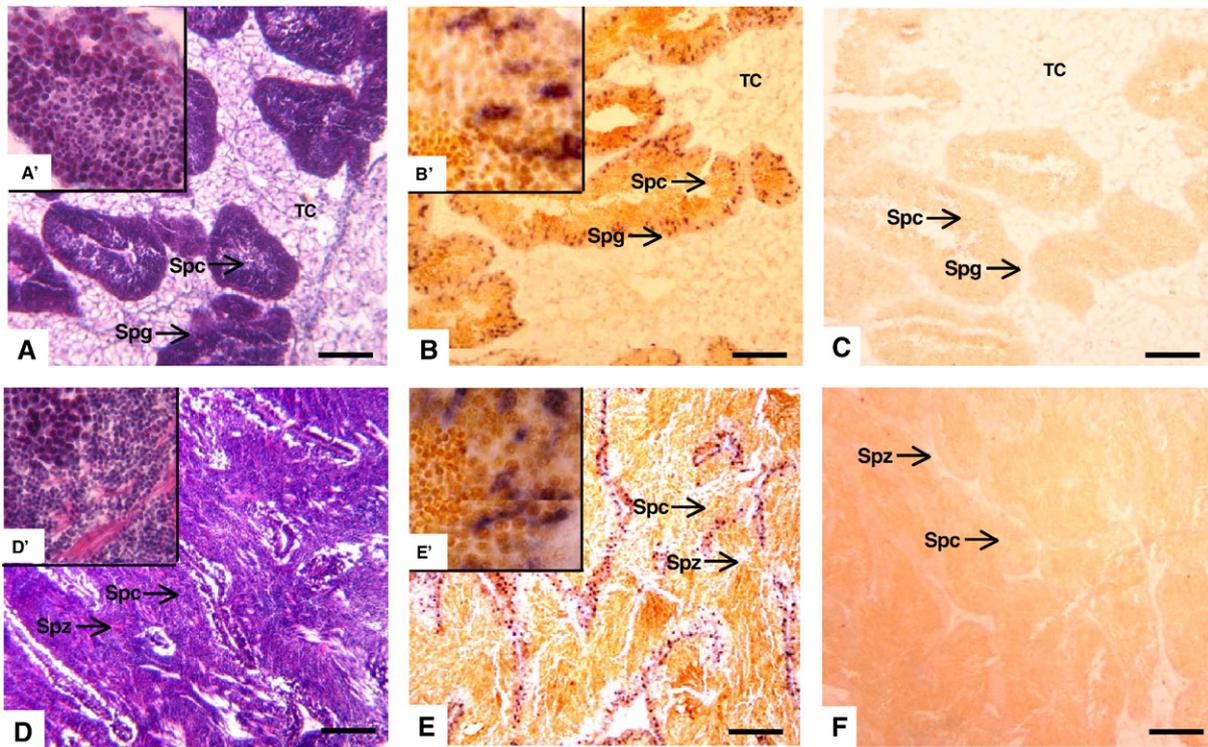


Fig. 6. Histological analysis and *oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like* expression by ISH in adult male *Crassostrea gigas* gonad. A, D: Histological analysis. A: maturation step, D: end of the maturation step. B, C, E, F: The *oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like* mRNA in male *C. gigas* gonad stained by ISH with an antisense probe. Positive cells are stained in dark blue. B: maturation step, C: negative control of the maturation step (sense probe), E: end of the maturation step, F: negative control of the maturation step (sense probe). TC: conjunctive tissue, Spg: spermatogonia, Spc: spermatocyte, Spz: spermatozoa. Scale bar: 15  $\mu$ m; magnification: 200x for each panel, except for A', B', D' and E': 2000 $\times$ .

fully mature, lumina of male tubules were filled with spermatozoa, while germinal epithelia still showed all stages of male germ cells (Fig. 6D). The periphery of tubules corresponding to early stages of germ cells was stained with a pattern similar to that observed during the first steps of maturation. Spermatogonia were still unstained (Fig 6E and E'). For all experiments, ISH controls using a sense probe did not generate any signal (Fig. 5 and 6, C and F).

## 4. Discussion

### 4.1. The oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like gene (*og-TGF $\beta$ -like*)

TGF $\beta$  members represent a widespread protein family in the animal kingdom, and some members have already been characterised in invertebrates. In *C. gigas*, two main members of this superfamily have been identified. The first, named mGDF, (Lelong et al., 2000) similar to human BMP2 and *Drosophila* DPP, is believed to play a role during metamorphosis. The second, Cg-TGF- $\beta$  (Lelong et al., 2007), displays homology with both vertebrate TGF- $\beta$ s and activins, and seems to regulate immune functions in molluscs. In this study, we report the characterisation of a cDNA encoding a newly characterized TGF- $\beta$  superfamily member, named *oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like* (*og-TGF $\beta$ -like*).

A common feature of most TGF $\beta$  members is the presence of seven conserved cysteine residues, six of which form a characteristic cysteine knot structure and one forms the inter-subunit, disulfide bond responsible for the covalent linkage of two subunits of the dimeric, biologically active ligand (Moore and Shimasaki, 2005). The *og-TGF $\beta$ -like* sequence has six conserved cysteines, including the fourth cysteine at position 271 which was shown for most members to be crucial for the formation of a functional, dimeric, mature protein (Daopin et al., 1992). As recently observed for teleost gonadal somat-derived growth factor (GSDF) implicated in proliferation of germ cells (Sawatari et al., 2007) this oyster sequence also lacks the seventh characteristic cysteine (replaced by a serine in position 306) involved in the cysteine knot structure.

Sequence and phylogenetic analyses (data not shown) revealed that *og-TGF $\beta$ -like* could not be certainly assigned to any of the known subfamilies. Although the closest homologue corresponds to BMP15, the percentage of identity between the mature region of the sequence studied with other related, mature ligands were always very low, suggesting that this newly-characterized *oyster-gonadal-TGF $\beta$ -like* gene is a derived member within the TGF $\beta$  superfamily.

### 4.2. *Og-TGF $\beta$ -like* expression during the maturation of the gonad

A high relative level of *og-TGF $\beta$ -like* mRNA has been detected exclusively in the gonad of both male and female oysters. This tissue-specific expression discriminates *Og-TGF $\beta$ -like* from other oyster TGF $\beta$  members, whose ubiquitous expression pattern suggests a pleiotropic role (Lelong et al., 2000; 2001; 2007). Moreover, the relative quantity of *og-*

*TGF $\beta$ -like* transcript increased continuously during the development of gonadic tubules in both sexes. Its maximum level was observed during active gametogenesis and, especially, when oysters were fully mature. A strong decrease in the relative *og-TGF $\beta$ -like* mRNA level was then observed when germ cells were expelled; it appears significant when gonadic tubules contain only residual germ cells and regress. This expression pattern suggests a role of *og-TGF $\beta$ -like* in oyster gonadal development. In contrast to early embryonic expression of some TGF- $\beta$  involved in primordial germ cell development, such as mammalian BMP4 and BMP8 (Chang et al., 2002), no significant *og-TGF $\beta$ -like* mRNA was found in any early oyster developmental stage (embryos and larva). This also contrasts with TGF $\beta$  members expressed in both developmental and reproduction stages, such as GSDF expressed during embryogenesis of the rainbow trout, and in the granulosa and Sertoli cells at later stages (Sawatari et al., 2007).

By ISH, *og-TGF $\beta$ -like* appeared exclusively located in cells surrounding oocytes in female and spermatogonia in males when germ cells mature; whereas, no staining was observed in the germ cells. The stained cells are elongated cells located around the tubule walls; they probably correspond to somatic cells, although these have never been described in *C. gigas*. In some invertebrates, ultrastructural studies describe somatic cells surrounding the germ cells, as “follicle cells” in the mussel (Eckelbarger and Young, 1999) or the sea spider (Miyazaki and Bilinski, 2006), or as “Sertoli cells” in the clams *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Erkan and Sousa, 2002). They were found to form a close morphological association with developing germinal cells, as their cytoplasmic processes penetrate the germ cells, suggesting interaction between them (Erkan and Sousa, 2002). These cells are believed to contribute to the synthesis and transport of nutrients and regulatory substances to the developing germ cells, to phagocytosis of residual cytoplasmic bodies and degenerated germ cells, and also to serve as a mechanical support for the development of germ cells (Hinsch, 1993). However, their function, in relation to regulation of spermatogenesis and oogenesis, remains to be demonstrated in molluscs. In *Drosophila*, the TGF $\beta$  signal-transduction pathway has been determined to affect germ-line stem cell number and the size of the stem cell niche (Schulz et al., 2004). This effect has also been observed for GSDF in the rainbow trout, which has a specific proliferation enhancing effect on the spermatogonia, and probably a maturation effect on the oocytes (Sawatari et al., 2007). The newly characterized member of TGF- $\beta$  superfamily *og-TGF $\beta$ -like* is, therefore, hypothesized to play a regulatory role in the differentiation and maturation of germ cells in the oyster *C. gigas* and constitutes a major starting point of further research on oyster reproduction.

### 4.3. *Oyster-TGF $\beta$ -like* is differentially expressed between summer mortality resistant and susceptible oyster families

Considering the hypothesized implication of *og-TGF $\beta$ -like* in gonad development and germ cells maturation in *C. gigas*, the identification of such a factor in a genetic screening for summer survival between R and S families is intriguing. Summer mortality,

however, occurs at the end of the maturation period and thus appears associated with reproduction (Worrall and Widdows, 1984). In addition, significant differences in reproduction were previously observed between R and S families, in terms of gonad investment and spawning, suggesting that R families can survive summer mortality (especially in eutrophic environment) because they are not as reproductively active as S families (Samain et al., 2007). In that case, the two-fold higher expression of *og-TGF $\beta$ -like* in R families might suggest a negative effect in gonad development of oyster. This was already observed for some TGF $\beta$  members, such as TGF $\beta$ 1, AMH or some BMP 15 in vertebrates (Kohli et al., 2005; Josso et al., 1998; Moore et al., 2004) in opposition to other TGF $\beta$  members known as potent stimulator of the folliculogenesis and the ovulation quota in mammals (Vitt and Hsueh, 2001; Knight and Glister, 2006).

All these points underline the strong interest of developing functional analysis of the *og-TGF $\beta$ -like* protein to establish its role in the reproduction of the oyster *C. gigas* and to test the hypothesis that reproductive effort may cause the higher rate of summer mortality of the selected, susceptible families.

## Acknowledgements

The authors are indebted to JY Daniel, V Quilien and T Dubrunfaut for technical assistance. We thank all the staff of the Argenton, Bouin and La Tremblade stations, especially L Dégremont, for providing oysters, and P Boudry as the supervisor of the selective breeding program. We thank JJ Lareyre, D Mazurais and J Moal for their comments on the manuscript and G Wikfors and H Hégaret for their help for editing the English language. We acknowledge the Max Planck Institute (Berlin, Germany) for sequencing clones, as part of the Marine Genomics Europe Network. This work was supported by the Morest project funded by Ifremer and by the regional councils of Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire and Poitou-Charentes and the council of Calvados. E. Fleury was funded by Ifremer and a Région Basse-Normandie doctoral grant.

## References

- Chang, H., Brown, C.W., Matzuk, M.M., 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr. Rev.* 23, 787–823.
- Cheney, D.P., MacDonald, B.F., 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.
- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y., Davies, D.R., 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257, 369–373.
- Dégremont, L., 2003. Genetic basis of summer mortality and relationship with growth and juvenile Pacific cupped oysters *Crassostrea gigas*. These de l'université de Caen 322.
- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E., Boudry, P., 2007. Summer mortality of hatchery produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 262, 41–53.
- Eckelbarger, K.J., Young, C.M., 1999. Ultrastructure of gametogenesis in a chemosynthetic mytilid bivalve (*Bathymodiulus childressi*) from a bathyal, methane seep environment (northern Gulf of Mexico). *Mar. Biol.* 135, 635–646.
- Erkan, M., Sousa, M., 2002. Fine structural study of the spermatogenic cycle in *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae). *Tissue Cell* 34, 262–272.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., et al., 2004a. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 592–598.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004b. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 897–904.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458–470.
- Herpin, A., Favrel, P., Cunningham, C., 2002. Gene structure and expression of *cg-ALR1*, a type I activin-like receptor from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 301, 21–30.
- Herpin, A., Lelong, C., Favrel, P., 2004. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 461–485.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F., Favrel, P., Cunningham, C., 2005a. Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway. *FEBS J.* 272, 3424–3440.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F.M., Favrel, P., Cunningham, C., 2005b. Structural and functional evidences for a type I TGF-beta sensu stricto receptor in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggest conserved molecular mechanisms controlling mesodermal patterning across bilateria. *Mech. Dev.* 122, 695–705.
- Hinsch, G.W., 1993. Comparative organization and cytology of Sertoli cells in invertebrates, FL. ed.
- Huvet, A., et al., 2003. Tissue expression of two alpha-amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effect of two different food rations. *Aquaculture* 321–333.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211–220.
- Itman, C., Mendis, S., Barakat, B., Loveland, K.L., 2006. All in the family: TGF-beta family action in testis development. *Reproduction* 132, 233–246.
- Josso, N., Racine, C., di Clemente, N., Rey, R., Xavier, F., 1998. The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 3–7.
- Knight, P.G., Glister, C., 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132, 191–206.
- Kohli, G., Clelland, E., Peng, C., 2005. Potential targets of transforming growth factor-beta1 during inhibition of oocyte maturation in zebrafish. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 53.
- Lelong, C., Mathieu, M., Favrel, P., 2000. Structure and expression of *mGDF*, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Eur. J. Biochem.* 267, 3986–3993.
- Lelong, C., Mathieu, M., Favrel, P., 2001. Identification of new bone morphogenetic protein-related members in invertebrates. *Biochimie* 83, 423–426.
- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quere, H., Rodet, F., Dubos, M.P., Favrel, P., 2007. *Cg-TGF-beta*, a TGF-beta/activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 30–38.
- Miyazaki, K., Bilinski, S.M., 2006. Ultrastructural investigations of the ovary and oogenesis in the pycnogonids *Cilunculus armatus* and *Ammothele biunguiculata* (Pycnogonida, Ammotheidae). *Invertebr. Biol.* 4, 346–353.
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F., 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 Lett.* 500, 64–70.
- Moore, R.K., Shimasaki, S., 2005. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol. Cell. Endocrinol.* 234, 67–73.
- Moore, R.K., Erickson, G.F., Shimasaki, S., 2004. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 356–361.

- Samain, J.F., et al., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. *Aquaculture* 268, 227–243.
- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2007. A novel transforming growth factor-beta superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Biol.* 301, 266–275.
- Schulz, C., et al., 2004. A misexpression screen reveals effects of bag-of-marbles and TGF beta class signaling on the *Drosophila* male germ-line stem cell lineage. *Genetics* 167, 707–723.
- Shimasaki, S., Moore, R.K., Otsuka, F., Erickson, G.F., 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* 25, 72–101.
- Tanguy, A., et al., 2008. A contribution of “Marine Genomic Europe” to the improvement of EST data in marine bivalves. *Gene* 408, 27–36.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.H., 2000. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25, 64–70.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.H., 1996. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 139–145.
- Vitt, U.A., Hsueh, A.J., 2001. Stage-dependent role of growth differentiation factor-9 in ovarian follicle development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183, 171–177.
- Worrall, C.M., Widdows, J., 1984. Investigation of factors influencing mortality in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol. Lett.* 5, 85–97.



---

**Quatrième chapitre :**  
**Conclusion et perspectives**

---



# 1. L'effort de production d'ESTs chez *C. gigas*

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons présenté les efforts récents réalisés dans le but d'augmenter le nombre d'ESTs disponibles chez *C. gigas*. Avec la mise en commun de plusieurs programmes permettant le séquençage de plus de 56000 ESTs, nous possédons aujourd'hui une base de données publique, contenant 29745 séquences spécifiques de *C. gigas*, augmentant ainsi de près de 85% le nombre d'ESTs par rapport aux entrées disponibles en 2006 sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cette base a effectivement permis de regrouper dans une base unique toutes les ESTs préalablement disponibles chez *C. gigas* telles que les ESTs provenant des banques d'hémocytes (Gueguen *et al.*, 2003), des banques contenant les ESTs associées à la réponse au stress (Boutet *et al.*, 2004 ; Tanguy *et al.*, 2004 ; Tanguy *et al.*, 2005) ou aux facteurs abiotiques (David *et al.*, 2005). Cette base contient également les ESTs issues du programme « Marine Genomics Europe » (Tanguy *et al.*, 2008) et les ESTs issues des programmes « Aquafirst » et « Génoscope ».

Le rassemblement de toutes ces ESTs dans une même base de données publique représente une très grande source d'information pour tout ce qui concerne les recherches en génomique associées à l'huître creuse *C. gigas*. En effet, l'existence de cette base facilitera la recherche de gène « candidat » en fonction des annotations disponibles, les analyses phylogénétiques, les recherches de microsatellites et de SNPs, le développement de cartographie génétique, ou encore la mise en place de techniques d'analyses transcriptomiques ou protéomiques à haut-débit. Les moteurs de recherche associés à la base permettent un accès simple et direct à l'ensemble des informations des ESTs, facilitant ainsi les requêtes associées à chaque travail.

La mise en place de cette base « GigasDatabase » ([http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/index.html](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html)) permet ainsi aux équipes impliquées d'être les leaders concernant le séquençage et la mise à disposition de séquences de *C. gigas*. Les perspectives concernant la base de données consistent donc à faire des mises à jour régulières, afin d'incorporer à la base les prochaines nouvelles séquences de *C. gigas*. Un accord « tacite » est pour le moment mis en place pour les mises à jour de la base durant les prochaines années (A. Huvet, C. Klopp de SIGEANE; com. pers.). Cependant, cela nécessitera à terme la désignation d'une personne officiellement responsable de cette base afin qu'elle continue d'être mise à jour régulièrement. De plus, la structure de cette base

pourra également être utilisée afin de stocker les données associées au séquençage complet du génome de l'huître creuse. En effet, un projet de séquençage du génome complet de *C. gigas* mené par l'Institute of Oceanology of Chinese Academy of Sciences (IOCAS) et le Beijing Genomics Institute (BGI) vient de débiter en Chine. Le consortium « Franco-Américain » nommé Oyster Genome Consortium (OGC) a pour perspective de participer à l'annotation du génome (voir poster en annexe 1 « Recent advances in EST sequencing in *Crassostrea gigas*: towards the sequencing of the Pacific oyster genome »).

Concernant le séquençage complet du génome des espèces marines, il est intéressant de noter que quelques espèces ont déjà été choisies comme modèles, notamment en évolution et biologie du développement, pour être séquencées. C'est en effet le cas des ascidies *Ciona intestinalis* et *Ciona savignyi* ou de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* de 814 Mb avec environ 23000 gènes estimés par le séquençage (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium *et al.*, 2006). En 2007, le séquençage du génome complet d'une algue verte unicellulaire nommée *Chlamydomonas reinhardtii* a également été réalisé (Merchant *et al.*, 2007). Cet eucaryote combine en effet certaines caractéristiques spécifiques aux plantes et d'autres propres aux animaux, et est utilisé en tant que modèle pour l'étude de la motilité des flagelles et de la photosynthèse. D'autres espèces font également l'objet de travaux de séquençage telles que le saumon, en lien avec son intérêt commercial (Adzhubei *et al.*, 2007) (<http://www.salmongenome.no>).

En ce qui concerne l'huître creuse *C. gigas*, plusieurs intérêts ont agi comme moteurs du développement de la recherche en génomique et du lancement du séquençage complet du génome de cette espèce. En effet, *C. gigas* est la première espèce aquacole en terme de production mondiale (4.4 millions de tonnes en 2004), générant ainsi une valeur commerciale de 2.8 milliards de dollars US (<http://www.FAO.org>). A l'instar d'autres mollusques marins, *C. gigas* est une espèce sentinelle de l'environnement marin dans les habitats côtiers et estuariens (Sarkar *et al.*, 2006). Enfin, *C. gigas* est particulièrement intéressante de part son emplacement phylogénétique car elle appartient au groupe des Lophotrocozoaires, groupe très peu documenté au niveau biologique et génomique au sein des Protostomiens. La seule espèce appartenant aux Lophotrocozoaires séquencée est le gastéropode *Lottia gigantea* dont le génome est d'environ 500 Mb (<http://genome.jgi-psf.org>).

A terme, l'obtention du séquençage complet du génome de *C. gigas* permettra d'envisager de nombreuses perspectives. En effet, les 15 années charnières entre le XX<sup>e</sup> et le XXI<sup>e</sup> siècle resteront marquées par les progrès spectaculaires de la biologie moléculaire, avec

en particulier des techniques et concepts de la génétique moléculaire appliqués aux espèces modèles, permettant d'identifier par l'analyse de mutants spontanés ou induits la fonction individuelle de milliers de gènes. On comprend ainsi que le balisage fin des génomes a beaucoup contribué à accélérer cette identification. De plus, il est désormais acquis que la compréhension des mécanismes de régulation du vivant doit dépasser l'étude de gènes isolés pour intégrer l'expression combinée et dynamique de l'ensemble des gènes. Dans cette optique, le décryptage des génomes a permis la mise en œuvre de techniques permettant d'analyser le résultat de l'expression du génome dans différents types cellulaires, placés dans des situations physiologiques ou pathologiques différentes, ou encore selon des lignées génétiquement sélectionnées, comme les souches d'huîtres Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale analysées dans cette thèse. L'analyse et la comparaison des profils obtenus passe par l'utilisation massive de l'outil informatique, omniprésent aujourd'hui dans la production et l'échange des données biologiques, mais aussi par la connaissance du génome étudié.

La transformation des schémas de pensée centrés autour de l'étude des fonctions « gène par gène » vers l'étude de multiples interactions entre les composants moléculaires et cellulaires de l'organisme s'accompagne du développement de nouvelles méthodes expérimentales. Depuis quelques années, on assiste ainsi à la mise en place de techniques de biologie moléculaire à haut débit afin d'avancer dans les réponses aux questions biologiques complexes telles que la biologie des cancers, la biologie du développement, la réponse aux maladies infectieuses ou, dans notre cas, l'étude de mortalité liée à des causes multifactorielles.

Le principe de ces analyses est basé sur le fait que toute cellule sait adapter son fonctionnement, en bien ou parfois en mal, selon des éléments fournis par sa propre activité et par des stimulus extérieurs. Ce processus adaptatif est en partie contrôlé par la plasticité de l'expression du génome. Cela revient à dire qu'une cellule ne contient pas un lot de transcrits figés mais, au contraire, remaniés en permanence. Ainsi, la caractérisation de l'ensemble ou d'une partie du transcriptome dans une situation donnée, correspond à une empreinte moléculaire spécifique de cet état particulier. En ce qui nous concerne, la comparaison des empreintes de tissus associés aux lignées d'huîtres Résistantes et Sensibles, doit donc amener à repérer les seuls transcrits dont l'expression diffère entre les deux états « résistants » ou « sensibles ». Les gènes codant ces produits-là sont ceux qui accompagnent, voire induisent les mécanismes adaptatifs des cellules. Ils sont donc les acteurs désignés pour mieux

comprendre les mécanismes de transition physiologique ou pathologique associés à la sensibilité aux mortalités estivales.

On saisit ici tout l'intérêt de disposer d'informations les plus complètes possibles sur l'expression du génome de l'huître. Le décryptage de sa séquence et le séquençage en masse de portions de transcrits permettront de définir avec précision les variants résultant de leur transcription. Avec ces possibilités d'acquérir des données sur l'expression de plusieurs milliers de gènes, la résolution de questions physiologiques complexes connaît avant tout une évolution méthodologique importante. Au contraire des expériences classiques conduites à l'échelle d'un gène unique et fondées sur le concept de la vérification d'une hypothèse initiale, ces approches globales évaluent en aveugle les variations d'expression de plusieurs gènes, sans *a priori*.

Dans le cadre de l'étude du phénomène complexe associé aux mortalités estivales, de premières études ont été développées selon une approche ciblée du métabolisme énergétique, via la comparaison de l'expression et de l'activité enzymatique de gènes impliqués dans ce processus physiologique entre les lignées R et S (Bacca, 2007). Cette approche a été réalisée car sur le plan énergétique, la période estivale est particulièrement difficile pour les huîtres creuses. En effet, l'augmentation de la température pendant cette période augmente les coûts métaboliques globaux. De plus, les processus de maturation des gamètes, associés à la diminution des réserves énergétiques, peuvent finalement conduire à un déficit énergétique. L'animal doit ainsi trouver des stratégies d'apport en énergie, via l'alimentation ou l'utilisation de ses réserves : il était donc intéressant d'étudier l'implication de l'énergie dans la survie estivale.

Les résultats indiquent que les voies métaboliques des sucres sont plus activées chez les huîtres R, suggérant un fonctionnement énergétique différent en période critique entre les huîtres R et S qui tournerait en faveur des huîtres R, avec une potentialité de production d'ATP accrue, et donc d'énergie disponible dans l'animal (Samain *et al.*, 2007). Malgré ce résultat encourageant, les mécanismes sélectionnés pour la résistance au phénomène complexe et multifactoriel des mortalités estivales restaient à élucider. C'est pourquoi nous avons développé dans cette thèse une approche sans *a priori* de comparaison transcriptomique par puce à ADN des lignées R et S au niveau gonadique, afin d'identifier de nouveaux déterminants moléculaires de la survie estivale.

## 2. La comparaison transcriptomique des lignées R et S

### 2.1 Le choix des plans expérimentaux

Le choix des différentes conditions (*in situ*, challenge bactérien, hypoxie et exposition aux sulfures) utilisées pour comparer les huîtres R et S par puce à ADN a été établi d'après les résultats du programme MOREST. C'est en effet d'après le modèle d'interaction entre l'environnement, les pathogènes et l'huître que les différentes expériences ont été entreprises (Figure 53). La thèse présentée ici se situe au niveau de la composante « huître », et plus particulièrement au niveau de la comparaison des lignées Résistantes et Sensibles au cours d'un épisode de mortalité observé *in situ*. Ainsi, afin d'analyser la « composante génétique » liée aux mortalités estivales, nous nous sommes replacés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la sélection divergente permettant d'obtenir les lignées Résistantes et Sensibles (Dégremont *et al.*, 2005). L'expérimentation réalisée sur le même site atelier (Fort Espagnol, Bretagne Sud), et durant la même période (*i.e.* d'avril à août) permettra d'identifier le(s) caractère(s) sélectionné(s) entre les huîtres R et S, cette expérimentation ayant déjà été validée pour l'observation du différentiel de mortalité entre les lignées R et S. Enfin, le choix d'étude du tissu gonade s'est justifié par l'importance que semble avoir la reproduction dans l'apparition des mortalités, comme nous l'avons présenté dans la partie 2.3.2.1 du chapitre « Introduction Générale ». Des prélèvements du manteau et des branchies ont également été réalisés lors de cette expérimentation, mais n'ont pas été analysés dans le cadre de cette thèse.

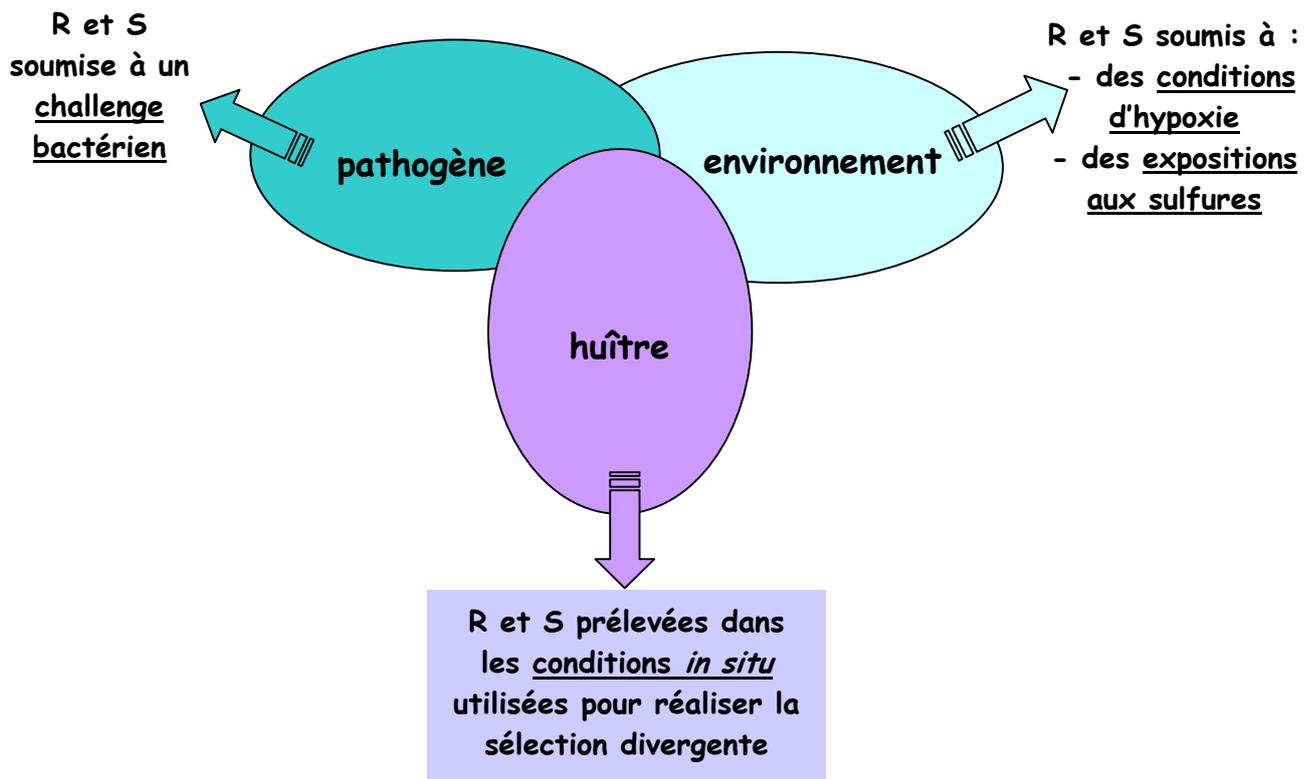


Figure 53 : Schéma récapitulatif des différentes expérimentations réalisées dans le cadre de la comparaison transcriptomique des lignées R et S. Le cadre violet représente les études présentées dans cette thèse.

D'autres analyses sont également en cours de réalisation pour étudier la réponse des huîtres R et S au facteur « pathogène ». Pour cela, des huîtres R et S ont été soumises (ou non) à un challenge bactérien, et les tissus manteau et branchies ont été prélevés : l'analyse des résultats devrait donc permettre d'identifier les gènes associés à la réponse aux attaques des pathogènes, et plus particulièrement d'identifier si ces réponses diffèrent entre les huîtres R et S. Dans la même optique, des analyses sont également en cours de réalisation pour étudier la réponse des huîtres R et S à certains facteurs liés à la composante « environnement ». Pour cela, les résultats du programme MOREST ayant mis en évidence une implication des déficits en oxygène dans l'apparition des mortalités (via par exemple l'augmentation de la température, et les apports d'eau douce), les réponses des huîtres R et S ont été comparées dans des conditions d'hypoxie et de normoxie, à partir de prélèvements de branchies et muscle. De même, des études sur la glande digestive d'huîtres R et S exposées (ou non) à des sulfures visent à mettre en évidence les gènes impliqués dans les réactions de stress associées

aux apports de polluants (via l'eau ou les sédiments) corrélés à l'apparition de fortes mortalités.

A terme, il sera très intéressant de confronter l'ensemble de ces résultats (*i.e.* les listes de gènes associés à l'étude de chacune de ces trois composantes obtenues sur des tissus communs) pour voir si l'on arrive à retrouver, par des conditions expérimentales, des variations d'expression de gènes comparables à celles observées *in situ* : ceci permettra alors d'incriminer plus directement tel ou tel facteur dans l'apparition des mortalités. De plus, l'association de « profils signatures » à chaque condition expérimentale analysée permettra de tester si ces phénomènes sont impliqués dans l'apparition des mortalités : par exemple, cela permettra de confirmer ou non l'implication du phénomène « hypoxie » dans l'apparition d'un phénomène de mortalité estivale, sachant qu'il n'est pas forcément associé à chaque épisode de mortalité.

## 2.2 L'identification de marqueurs moléculaires du caractère sélectionné : la résistance aux mortalités estivales

L'analyse transcriptomique par puce à ADN, réalisée pour la première fois chez *C. gigas*, a permis de sélectionner, via des analyses statistiques dites « stringentes » ( $FDR < 3\%$ ), une liste de 34 candidats différentiellement exprimés durant 4 dates précédant l'apparition des mortalités. Cette analyse, réalisée dans le but d'identifier des marqueurs moléculaires pourrait servir, à terme, de « profil diagnostique » afin de détecter la potentielle résistance des huîtres. Il faudrait pour cela réaliser à nouveau ces comparaisons transcriptomiques en multipliant au maximum le nombre de paramètres « extérieurs » et le nombre d'animaux étudiés, afin de valider le différentiel d'expression des gènes candidats selon le plus de conditions possibles. En augmentant le nombre d'analyses, nous pourrions ainsi fiabiliser la liste de gènes obtenue et l'associer de façon systématique à un différentiel de survie. Ce type d'approche est déjà largement développé chez l'humain (Nebert & Vesell, 2004), afin de prédire par exemple, la sensibilité d'un patient à un traitement anti-cancéreux (Chanrion *et al.*, 2008).

Pour cela, il pourrait être envisagé de renouveler les analyses (en utilisant des lames de verre issues du même lot) sur de larges échantillonnages (pluriannuel, multi-sites) obtenus dans le cadre de « l'observatoire des mortalités » en cours de mise en place par l'IFREMER suite aux fortes mortalités observées durant l'été 2008. En effet, ce projet permettra de disposer de prélèvements associés à chaque épisode de mortalité répertorié.

Parmi les 34 candidats sélectionnés, nous en avons sélectionné 8 d'après leurs annotations reliées à des processus biologiques suspectés d'intervenir dans la mortalité, tels que la reproduction, le stress oxydatif, ou encore le métabolisme énergétique. Un autre candidat non annoté (CK172373) a également été sélectionné, pour son niveau d'expression très élevé (en moyenne cinq fois plus élevé que les taux d'expression des autres gènes analysés) et son différentiel systématiquement observé entre R et S dans plusieurs analyses (*i.e.* Huvet *et al.*, 2004 ; Fleury *et al.*, 2008). Ces neuf candidats ont été analysés sur d'autres échantillons R et S par PCR en temps réel, afin de tester si leurs différentiels d'expression observés entre les huîtres R et S étaient robustes aux changements de conditions (âge, génération, environnement). Il est apparu que pour sept de ces candidats, un différentiel significatif entre R et S était retrouvé lorsque des mortalités significatives étaient observées dans le milieu. Ces gènes constituent donc des candidats d'intérêt pour la mise en place des profils diagnostiques dont nous parlions dans le paragraphe précédent, mais aussi des candidats « prioritaires » à étudier un par un d'un point de vue fonctionnel et génétique afin de définir leur rôle au sein de l'huître et, à terme, d'étudier leur implication dans l'apparition des mortalités estivales.

D'un point de vue génétique, un moyen permettant d'étudier l'implication d'un gène dans les mortalités estivales serait de l'associer à des zones Quantitative Trait Loci (QTLs), c'est-à-dire à des zones du génome statistiquement liées au caractère « survie estivale ». Il sera donc très intéressant de suivre la localisation de ces candidats dans les cartes génétiques (en cours de réalisation par l'équipe LGP, IFREMER La Tremblade), afin d'étudier si ces candidats co-localisent dans des zones QTLs portant les gènes responsables de la variance liée au caractère « survie estivale ». En effet, les cartes génétiques permettent de localiser un locus associé à un trait particulier (donc dans notre cas, la résistance aux mortalités estivales) dans un intervalle chromosomique d'abord assez large, puis réduit par l'utilisation de marqueurs polymorphes additionnels. Ce polymorphisme est ensuite exploité pour identifier entre les individus de générations successives les zones de recombinaison chromosomique, paramètre étalon pour restreindre de proche en proche la portion de chromosome impliquée dans le développement du caractère. *In fine*, lorsque l'intervalle sera réduit au point de ne plus englober que quelques gènes dits « candidats », les données de séquences serviront pour amplifier et comparer l'ADN des huîtres R avec celui des huîtres S, étape essentielle dans l'identification des mutations causales délétères. Cependant, dans la mesure où les cartes génétiques de l'huître *C. gigas* sont aujourd'hui loin d'être saturées, il était intéressant de

fournir aux généticiens des candidats d'intérêts « prioritaires » pour la localisation sur les cartes génétiques et la recherche de QTLs.

Les premiers résultats sont très encourageants car les analyses génétiques de cartographie et d'identification de QTLs réalisées dans le cadre de la thèse de C. Sauvage (2008) ont permis de localiser l'un des candidats, le gène *og-TGFβ-like*, au sein de l'une des cinq zones QTLs (Figure 54). Ce gène est donc potentiellement impliqué dans l'apparition des mortalités, mais il reste désormais à développer des analyses fonctionnelles pour comprendre quelles sont les conséquences de sa sur-expression chez les huîtres R.

Enfin, il faudra attendre les résultats associés aux autres candidats définis par les analyses microarrays, qui n'ont pas encore été cartographiés.

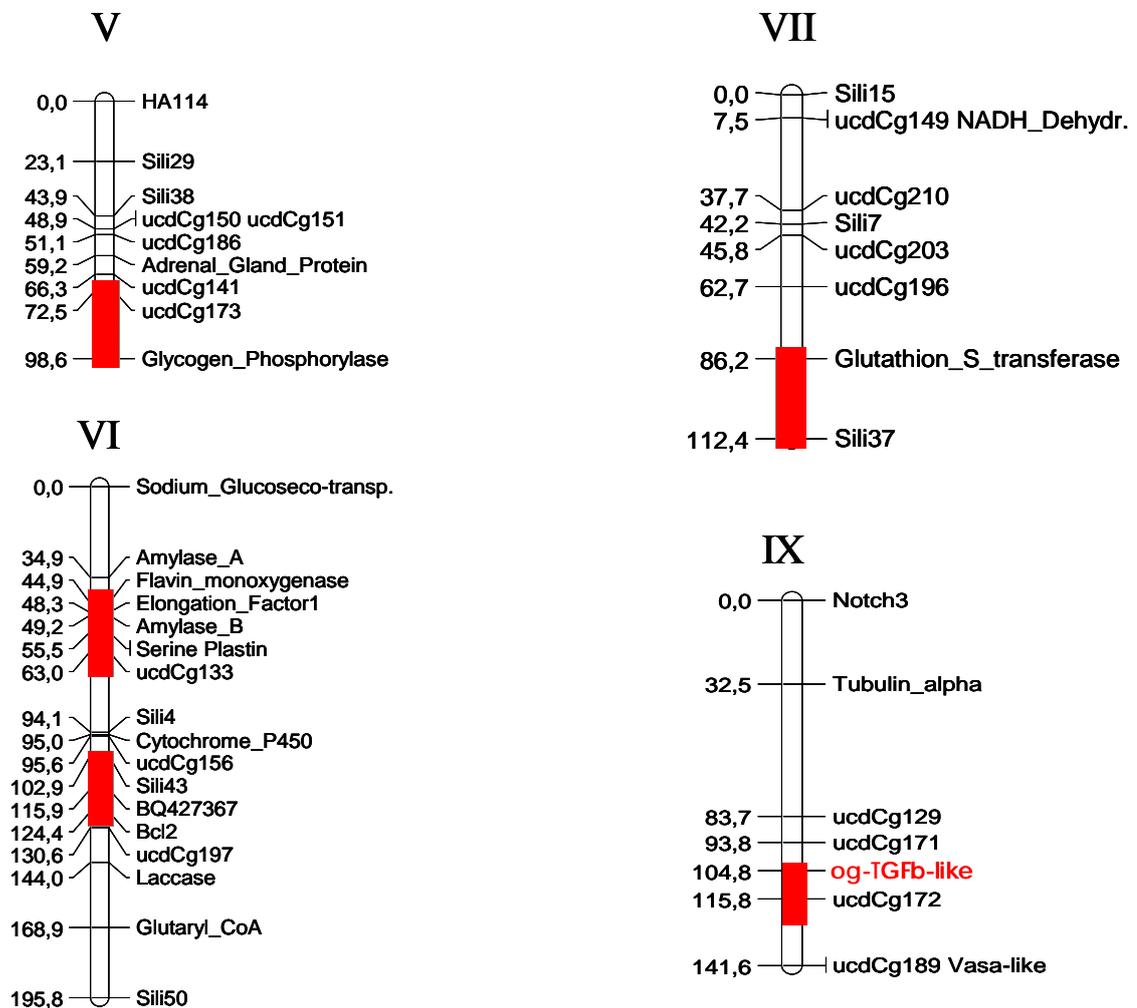


Figure 54 : Localisation des 5 zones QTLs (en rouge) sur une partie de la cartographie génétique consensus. Le gène *og-TGFβ-like* co-localise avec l'une des 5 zones QTLs liées au caractère « survie estivale ». D'après C. Sauvage (2008).

## 2.3 Les mortalités estivales : quels sont les processus biologiques suspectés d'être affectés ?

Les processus associés aux différents candidats sélectionnés dans la gonade pour leur différentiel entre les huîtres R et S nous permettent de bâtir quelques hypothèses quant aux événements pouvant conduire à la mortalité, via l'identification de candidats « clefs » (Figure 55). En effet, les pistes privilégiées par rapport à nos résultats seraient, dans un premier temps, un investissement reproducteur plus important chez les huîtres S par rapport aux huîtres R, pouvant conduire à un affaiblissement physiologique des huîtres S, en lien direct avec le coût énergétique de la reproduction. A cela s'ajoutent les différences des mécanismes de défense contre le stress oxydatif, qui seraient défaillants chez les huîtres S, les rendant beaucoup plus sensibles aux stress. Cette hypothèse peut d'ailleurs être liée à l'augmentation de RLO observée chez les huîtres S quelques temps avant la mortalité (Samain *et al.*, 2007). En effet, la synthèse de RLO plus forte chez les huîtres S, connue pour être associée à des mécanismes de défenses contre les agressions externes (Canesi *et al.*, 2002), pourrait signifier qu'elles sont plus sensibles aux attaques extérieures et qu'elles « sur-réagissent » en produisant en excès ces radicaux libres. De plus, la synthèse de ces radicaux libres n'est pas ou peu modulée par les molécules anti-oxydantes, qui sont sous-exprimées chez les huîtres S. Ainsi, la synthèse excessive de RLO pourrait contribuer à affaiblir davantage les huîtres S, via des phénomènes de peroxydation des lipides, d'oxydation de protéines ou encore de dommages à l'ADN.

Enfin, au moment où les huîtres S arrivent dans une situation délicate avec des besoins métaboliques au maximum, des réserves énergétiques au minimum et une sensibilité accrue au stress, il est possible d'imaginer que tout facteur supplémentaire aggrave la situation. Les huîtres S ainsi affaiblies pourraient voir leurs capacités de défense immunitaire diminuer, les rendant ainsi plus vulnérables aux attaques des pathogènes présents dans l'environnement, comme cela a déjà été suggéré par Lacoste *et al.* (2002). Cette hypothèse est ici confortée par l'apparition, à la date 4 précédant le pic de mortalité, de plusieurs gènes différenciellement exprimés entre les huîtres R et S, dont 59% en lien avec l'immunité.

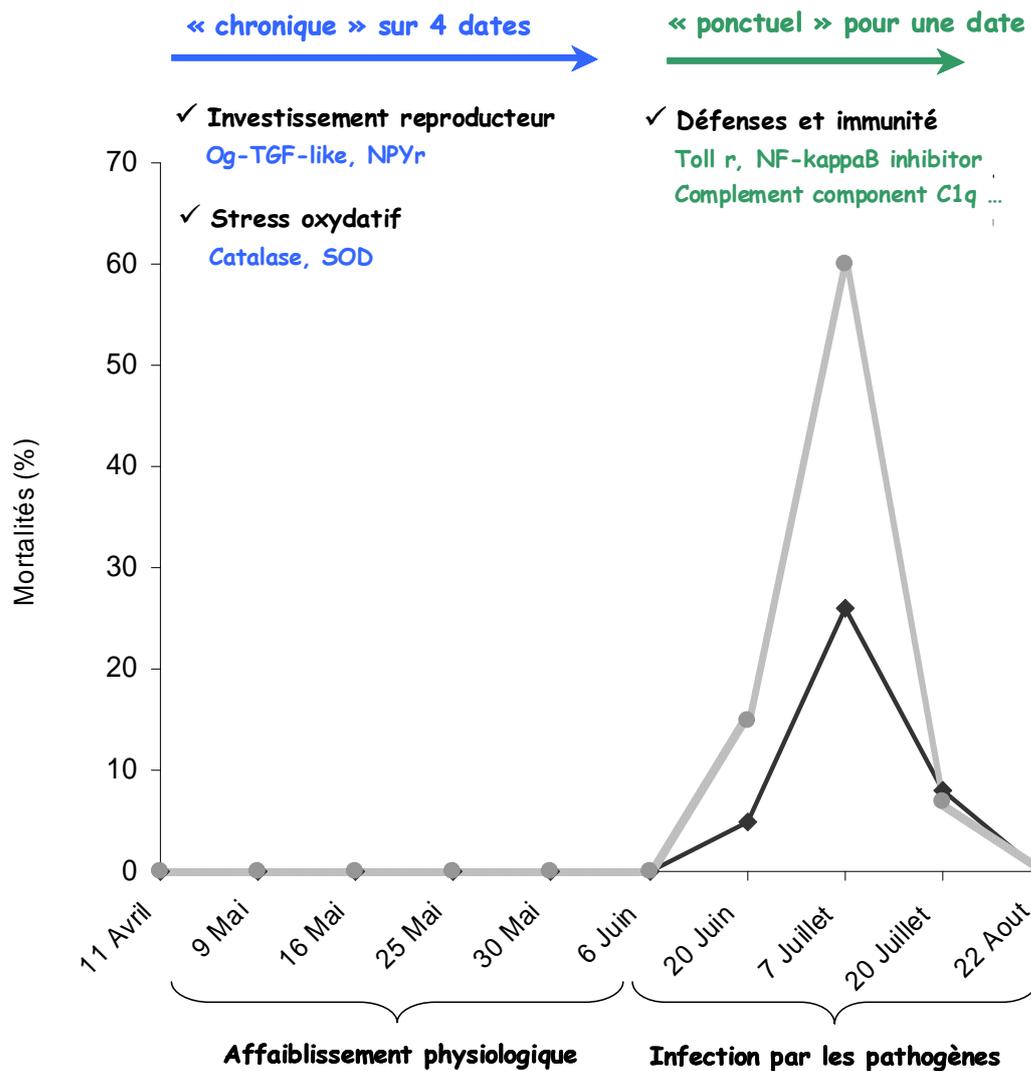


Figure 55 : Principales hypothèses associées à l'apparition des mortalités, issues de l'identification de gènes candidats par l'analyse microarray. Les gènes figurant en bleu ont été identifiés par ANOVA sur l'ensemble des 4 dates analysées. Les gènes figurant en vert ont été identifiés par ANOVA uniquement sur la date précédant l'apparition des mortalités.

La réalisation de ce schéma résumant l'ensemble des processus potentiellement affectés lors des mortalités estivales a été permise par l'identification de gènes différentiellement exprimés, dont les annotations confortaient les différentes hypothèses précédemment émises.

En effet, l'analyse a permis de sélectionner une EST annotée en tant que *oyster-gonadal-TGFβ-like* (*og-TGFβ-like*) dont les premières études physiologiques ont révélé qu'il est impliqué dans la reproduction et plus particulièrement dans la maturation et/ou la différenciation des cellules germinales (Fleury *et al.*, 2008). Les nombreux exemples des membres appartenant à la même famille pouvant jouer un rôle inhibiteur sur le développement

gonadique (*i.e.* TGF $\beta$ 1 Kohli *et al.*, 2005 ; BMP15 Moore *et al.*, 2004 ou AMH Josso *et al.*, 1998) permettent de lier sa sur-expression chez les huîtres R à l'investissement plus modéré dans la reproduction observée par rapport aux huîtres S. Ceci rejoint ainsi les études phénotypiques préalablement réalisées sur les lignées R et S mettant en évidence des différences au niveau des stratégies de reproduction, les huîtres S investissant plus dans la reproduction que les huîtres R, en produisant une gonade de taille supérieure (Samain *et al.*, 2007). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés lors d'une étude récente (Huvet *et al.*, in prep.) réalisée sur cinq lots R et cinq lots S montrant que la surface moyenne de gonade estimée pour l'ensemble des lots R est de 35% contre 46% pour les lots S. Ces résultats, associés au fait que la surface de gonade est liée au nombre de gamètes produits et ainsi représentative de l'investissement reproducteur (Enriquez-Diaz, 2004), laissent donc supposer que l'effort reproducteur est corrélé à la survie estivale.

Cette hypothèse est particulièrement intéressante lorsqu'elle est mise en relation avec les nombreuses études montrant que l'investissement dans la reproduction peut jouer sur la survie : on parle alors de « trade-offs » (effet de compensation) entre la reproduction et la survie, comme cela a été montré chez l'huître (Ernande *et al.*, 2004). En effet, l'investissement dans la reproduction est connu pour être très important chez l'huître adulte, étant donné qu'elle peut y consacrer une très grande partie de son énergie afin de produire une gonade pouvant représenter jusqu'à 80% du poids de l'animal (Deslous-Paoli *et al.*, 1981). Ainsi, il est possible d'imaginer que l'investissement et l'énergie allouée à la reproduction se font aux dépens de la survie de l'animal, comme cela a déjà été montré chez la crevette chez qui la durée de vie est négativement corrélée à la durée de la période de reproduction (Browne *et al.*, 1982). Un autre exemple, chez la moule, a également mis en évidence un lien direct entre les coûts énergétiques liés à la reproduction et l'apparition de mortalités estivales (Myrand *et al.*, 2000). Enfin, chez la drosophile, des études ont également montré de forts impacts de la reproduction sur la durée de vie de ces insectes (Partridge & Prowse, 1997). L'ensemble de ces résultats permet donc de suspecter l'investissement dans la reproduction comme l'un des facteurs clefs dans l'apparition des mortalités estivales de l'huître.

L'identification d'une EST annotée en tant que récepteur au Neuropeptide Y (NPYr) systématiquement sur-exprimé chez les huîtres R représente également un acteur important dans l'hypothèse proposée. En effet, les études bibliographiques montrent que le Neuropeptide Y, via les interactions avec ses récepteurs, peut freiner l'investissement dans la reproduction en fonction de la disponibilité en énergie (Bojkowska *et al.*, 2008). De plus, ce

candidat apparaît particulièrement intéressant à étudier par rapport à notre problématique des mortalités estivales, car il se situe « au carrefour » des processus potentiellement impliqués dans l'apparition des mortalités. En effet, plusieurs études ont déjà montré qu'il peut réguler à la fois la reproduction et les dépenses énergétiques via la régulation de la prise alimentaire chez les vertébrés, en réduisant l'investissement dans la reproduction lorsque les prises alimentaires sont excessives (Schneider, 2004 ; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2006). Le NPY peut également influencer les mécanismes de défenses anti-oxydant, comme cela a été montré chez le poisson-chat, chez qui l'administration de NPY sous forme de protéine recombinante est corrélée à une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (Carpio *et al.*, 2007). Ainsi, la sous-expression systématique du NPYr observée pour les huîtres S pourrait être liée au déficit d'expression des molécules anti-oxydantes.

D'autres analyses (voir poster « NPY signalling in the gonad of the oyster *Crassostrea gigas*: involvement in summer mortality? » en annexe 2) ont montré que son expression diminue en fonction des stades de développement de la gonade, mais également en fonction des conditions nutritives. Ces premiers résultats vont donc dans le sens des hypothèses liées à un contrôle « inhibiteur de la reproduction » du NPYr, qui diminue lorsque les conditions nutritives (et donc les sources potentielles d'énergie) augmentent. Cette observation est d'autant plus intéressante lorsque l'on sait que les différences d'investissement reproducteur observées entre les huîtres R et S sont exacerbées lorsque les conditions nutritives sont élevées (Samain *et al.*, 2007). Les résultats obtenus corréleront donc bien avec une augmentation de l'effort reproducteur chez les huîtres S, via une diminution de l'expression du NPYr, d'autant plus faible lorsque les conditions nutritives augmentent.

Il apparaît également que les huîtres R et S présentent des différences en terme de réponse au stress. Ceci n'est *a priori* pas surprenant dans la mesure où plusieurs études ont montré que l'investissement dans la reproduction a des conséquences directes sur la gestion du stress oxydatif (Wang *et al.*, 2001 ; Alonso-Alvarez *et al.*, 2004). Ainsi, l'identification d'ESTs sous-exprimées chez les huîtres S annotées en tant que catalase et superoxyde dismutase suggère que la réponse au stress, et plus particulièrement les capacités de défense anti-oxydante, sont défailtantes chez les huîtres S par rapport aux huîtres R. De plus, ces candidats ont été identifiés différenciellement exprimés entre les huîtres R et S pour les 4 dates précédant l'apparition des mortalités, ce qui laisse supposer une défaillance « chronique » du système anti-oxydant chez les huîtres S, différant ainsi d'une réponse « artefactuelle » associée à un stress environnemental ponctuel. Enfin, si l'on prend en compte le fait que très

peu de marqueurs du stress oxydatif sont présents sur la puce analysée (quatre en tout), l'identification de deux de ces marqueurs parmi nos gènes sélectionnés laisse donc supposer que ce processus physiologique pourrait être l'un des processus clef affecté lors des mortalités estivales.

Enfin, une dernière analyse réalisée sur les données de microarrays uniquement associées à la date précédant l'apparition des mortalités a permis d'identifier 61 ESTs significativement différentiellement exprimées entre les huîtres R et S, dont 36 ayant une annotation se rapportant aux fonctions immunitaires. En effet, se trouvent parmi les gènes identifiés des ESTs annotées en tant que récepteur Toll (Yang *et al.*, 2008), inhibiteur de la voie NFκB (Montagnani *et al.*, 2008), ou encore appartenant à la cascade du complément (Courtney-Smith *et al.*, 1999 ; Tahtouh *et al.*, 2008). Ce résultat, permettant d'associer près de 60% des gènes identifiés à l'immunité, met ainsi en évidence une sur-représentativité des gènes associés à la fonction immunitaire, mais ce juste avant l'apparition des mortalités (les analyses portant sur les quatre dates n'ayant identifié que très peu de gènes associés à l'immunité). On pourrait ainsi faire l'hypothèse que l'intervention des pathogènes présents dans le milieu affectent des huîtres préalablement affaiblies par l'ensemble des processus mentionnés plus haut, et apportent ainsi un « coup fatal » aux huîtres dont les défenses immunitaires seraient déterminantes et donc vraisemblablement défailtantes chez les huîtres S (ou plus efficaces chez les huîtres R).

Il est important de garder à l'esprit que les analyses de microarray représentent un tremplin pour entrevoir de nouvelles pistes à étudier pour répondre à la question posée, à savoir quels sont processus affectés lors des mortalités estivales. Les résultats issus de ces analyses, à eux seuls, ne suffisent pas à identifier clairement les mécanismes mis en jeu. Il est donc indispensable de revenir à des études fonctionnelles pour les candidats définis comme « prioritaires », afin de comprendre leur fonctionnement et tester leur implication dans le phénomène étudié.

C'est dans cette optique que nous avons choisi d'approfondir les analyses concernant le gène *og-TGFβ-like*, afin d'avancer dans l'étude de sa fonction au sein de l'huître et de voir s'il peut constituer un gène « coupable » dans l'apparition des mortalités estivales.

### 3. Le gène *og-TGFβ-like* : un gène « coupable » dans les mortalités estivales ?

Le candidat annoté en tant que *og-TGFβ-like* a été trouvé significativement sur-exprimé chez les lignées R par rapport aux S lors des différentes comparaisons effectuées (*i.e.* par microarray sur les quatre dates précédant l'apparition des mortalités, et sur des huîtres R et S d'âge, de génération et d'environnement différents, lorsque des mortalités significatives sont observées dans le milieu). De plus, les études génétiques réalisées par C. Sauvage (2008) ont permis de localiser ce candidat dans l'une des cinq zones QTLs associées au caractère « survie estivale ». Nous avons donc réalisé des analyses spatio-temporelles de ce candidat afin d'avancer dans la compréhension de son fonctionnement chez l'huître, pour à terme, déterminer s'il peut être un gène « coupable » dans les mortalités estivales.

Les résultats confirment l'implication de *og-TGFβ-like* dans la reproduction avec une expression exclusive dans la gonade, dont les niveaux d'expression augmentent au cours du développement gonadique, et diminuent après la ponte. De plus, les analyses par HIS ont permis de localiser l'ARNm spécifiquement au niveau des cellules somatiques entourant les cellules germinales. Ces cellules somatiques, encore peu étudiées chez *C. gigas*, semblent impliquées dans le développement et/ou la maturation des cellules germinales via des signaux hormonaux ou via des communications par des ponts cytoplasmiques (Hinsch, 1993 ; Erkan & Souza, 2002, Franco *et al.*, 2008). En fonction de ces résultats, et des analyses bibliographiques des membres appartenant à la même famille des TGFβ, nous avons supposé un rôle inhibiteur de ce gène sur le développement et/ou la maturation des cellules germinales (Fleury *et al.*, 2008).

Cependant, d'autres analyses sont désormais nécessaires pour valider cette potentielle fonction. Nous avons donc réalisé des expériences d'injection d'un anticorps hétérologue anti-TGFβ nommé « Pan-specific TGFβ antibody », afin d'inhiber l'expression de *og-TGFβ-like* (collaboration C. Corporeau), comme cela a déjà été réalisé chez le rat, par injection *in vivo* (Ma *et al.*, 2004). En effet, il existe de nombreuses expériences réalisées chez d'autres espèces ayant mis en évidence des inhibitions de gènes par l'utilisation de cet anticorps, comme chez le poulet (Mendez *et al.*, 2006), où l'utilisation du « betaglycan » (un antagoniste

naturel des TGF $\beta$ ) a permis d'inhiber les fonctions des TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 2, qui sont normalement capables de réduire le nombre de cellules somatiques dans les ovaires. Pour cela, nous nous sommes basés sur les techniques d'injection déjà maîtrisées au laboratoire via la mise en place de la technique du RNA interférence (RNAi) (Fabioux *et al.*, soumis). Des huîtres en stade 2 ont été régulièrement injectées (dans le muscle ou dans la gonade) pendant trois semaines (à raison d'une injection tous les quatre jours) avec l'anti-corps, ou du PBS pour les huîtres témoins. Des huîtres témoins non injectées nous ont permis de suivre le développement gamétogénétique des huîtres « standard » et l'expérience a été arrêtée lorsque toutes les huîtres témoins ont atteint le stade 3. Les résultats de cette expérience sont en cours d'analyse, mais des résultats préliminaires ont déjà permis de montrer que le « Pan-specific TGF $\beta$  antibody » reconnaît plusieurs bandes par immuno-détection sur western blot à partir d'un extrait de tissu gonadique, dont une correspondant au poids moléculaire de la protéine og-TGF $\beta$ -like (C. Corporeau, com. pers.). Des analyses histologiques (qualitatives et quantitatives) permettront d'observer si un phénotype visible peut être associé à l'inhibition de ce gène, en comparaison avec le phénotype des individus témoins. En fonction du rôle inhibiteur du développement gonadique aujourd'hui supposé pour *og-TGF $\beta$ -like*, un succès de l'expérience se traduirait par un développement gonadique plus important pour les huîtres où l'anti-corps « Pan-specific TGF $\beta$  antibody » a été injecté.

Toujours dans l'objectif d'avancer dans la compréhension de *og-TGF $\beta$ -like* chez *C. gigas*, d'autres analyses sont également envisagées, telles que l'inhibition de l'expression de ce gène par RNAi, technique récemment mise au point au laboratoire (Fabioux *et al.*, soumis). Cette analyse sera réalisée dans le but d'observer les conséquences phénotypiques de son inhibition au niveau du développement gonadique, comme pour l'expérience précédente. La synthèse de la protéine recombinante correspondant à ce gène a également été produite (collaboration Roscoff, M. Czjzek, C. Corporeau, com. pers.), ce qui devrait permettre la synthèse d'un anticorps spécifique de ce gène et de renouveler les expériences d'inhibition. Il pourrait également être envisagé d'analyser les effets liés à la sur-expression de ce gène, via l'injection de la protéine recombinante comme cela a déjà été réalisé pour l'étude du TGF $\beta$ -1 chez la limace (Franchini *et al.*, 2000), ou par l'addition de cette protéine recombinante à des cultures cellulaires de gonade, comme réalisé pour l'étude du GSDF chez la truite (Sawatari *et al.*, 2007).

Enfin, une fois que la fonction de ce candidat sera validée au sein de l'huître, son lien avec la survie estivale sera de nouveau analysé. On pourrait ainsi imaginer inhiber par RNAi

l'expression du gène *og-TGFβ-like* dans les lignées S, et comparer, par rapport à des expériences témoins, si l'on a significativement augmenté les taux de survie.

**E**n conclusion, au cours de cette thèse, nous avons mis en place des outils de génomique spécifiques à l'huître creuse *Crassostrea gigas*, permettant la création d'une base de données unique contenant aujourd'hui près de 29750 séquences. La génération d'un grand nombre de séquences spécifiques de *C. gigas* a permis la création de la première puce à ADNc spécifique de *C. gigas*. L'analyse *microarray* réalisée visant à identifier le(s) caractère(s) sélectionné(s) entre les huîtres R et S a permis de définir une liste de candidats notamment associés aux processus de reproduction et de stress oxydatif, soulignant le coût de la reproduction et l'importance de la défense anti-oxydante dans l'expression d'une vulnérabilité face aux pathogènes, observée par l'apparition de nombreux gènes immunitaires différenciellement exprimés entre R et S, uniquement à la date précédant les mortalités.

L'ensemble des candidats identifiés constitue une liste de candidats prioritaires qui seront tous cartographiés et analysés afin d'observer si, comme cela a été le cas pour le gène *og-TGFβ-like*, ces gènes peuvent appartenir à des zones QTLs associés au caractère « survie estivale ». De plus, les analyses fonctionnelles en cours de mise au point sur *og-TGFβ-like* pourront également être développées sur d'autres candidats d'intérêt, tels que le NPYr et son ligand, qui semblent être des candidats très intéressants à analyser dans le cadre des mortalités estivales, de par leurs potentielles fonctions liées à la reproduction et à la balance énergétique.

Enfin, la création d'une base de données unique et la mise au point de la technique d'analyse par puce à ADN chez *C. gigas* ont ouvert de nouvelles perspectives d'études de génomique pour cette espèce. Nous pouvons par exemple citer l'étude du transcriptome de la gonade qui sera prochainement réalisée par *microarray* (via l'ensemble des séquences disponibles dans la base), dans le cadre du programme ANR « Gamétogènes ». Cette étude permettra d'identifier de nouveaux gènes spécifiques de la gonade, ou encore de définir des clusters de gènes impliqués dans les différents processus de la reproduction.

---

# **Annexes**

---



## Annexe 1

**« Recent advances in EST sequencing in *Crassostrea gigas*: towards the sequencing of the Pacific oyster genome. »**



# Recent advances in EST sequencing in *Crassostrea gigas*: towards the sequencing of the Pacific oyster genome.

P Boudry<sup>1</sup>, A Huvet<sup>2</sup>, S Lapègue<sup>1</sup>, C. Sauvage<sup>1</sup>, A Tanguy<sup>3</sup>, D Moraga<sup>4</sup>, A Goostrey<sup>5</sup>, P Prunet<sup>6</sup>, V Boulo<sup>7</sup>, Y Gueguen<sup>7</sup>, J Moal<sup>2</sup>, E. Fleury<sup>2</sup>, JF Samain<sup>2</sup>, M Mathieu<sup>2</sup>, P Favrel<sup>2</sup>

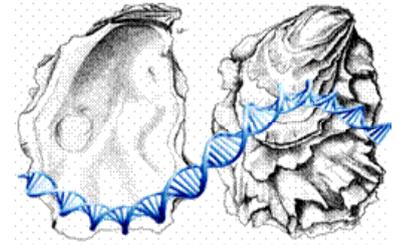
<sup>1</sup>LGP Ifremer La Tremblade, <sup>2</sup>UMR PEMM Ifremer Brest/Univ. Caen, <sup>3</sup>CNRS-Université Paris VI, Roscoff, <sup>4</sup>LEMAR, University of Brest, <sup>5</sup>Marine Laboratory, Plymouth, <sup>6</sup>SCRIBE, INRA, Rennes, <sup>7</sup>UMR 5119 Ifremer-CNRS-Université Montpellier II.

## Introduction

Rationale for EST and genome sequencing of the Pacific oyster:

- its membership of the Lophotrochozoa, a little studied branch of the Eukaryotes,
- its worldwide aquacultural importance (4.2 million metric tons, worth 3.5 billion US dollars),
- its high fecundity, with concomitantly high DNA polymorphism,
- its use as a biosensor of coastal pollution.

In 2004, an international community of biologists, the Oyster Genome Consortium (OGC) led by D. Hedgecock (University of Southern California) and uniting 70 participants from 10 countries, first presented the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a genome-sequencing candidate to Joint Genome Institute (JGI, USA) (Hedgecock et al., 2005). Besides this project (that remains to be accepted), several EST sequencing projects have been successfully initiated at JGI, Genoscope (France) and the Max Planck Institute (Germany). These will considerably enlarge the first public database specifically dedicated to *C. gigas* (Gueguen et al., 2003; www.ifremer.fr/GigasBase).



## Genome size and characteristics

Consensus haploid genome size is ~0.89 pg or 824 Mb. Genome sizes of 174 mollusks range from 0.43pg (for the limpet *Lottia gigantea*) to 5.88pg (for the whelk *Neobuccinum eatoni*), with a mean of  $1.80 \pm 0.07$ pg. Among those, only 23 mollusks have genome sizes smaller than that of the Pacific oyster.

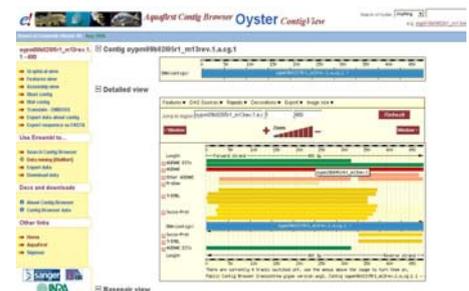
Protein polymorphism of marine bivalves is among the highest for animals. In the Pacific oyster, the average density of SNPs was estimated to be among the highest levels reported to date with one SNP every 61 bp in coding regions and one every 41 bp in non-coding regions (Sauvage et al., submitted). As a result, abundant non-amplifying PCR-null alleles are commonly observed. Because of the enormous fecundity and the very large population sizes in this species, a high genetic load is maintained in wild populations, explaining (1) frequent distorted inheritance ratios in lab-reared progeny of wild parents and (2) correlation of heterozygosity with fitness related traits in natural populations.

The available microsatellite and AFLP-based linkage maps (Hubert and Hedgecock 2004 ; Yu and Guo 2003), have 10 linkage groups, in accord with haploid chromosome number and cover ~80% of the Pacific oyster genome. SNPs are now being mapped and a physical map is being developed using a BAC (Cunningham et al., 2006) fingerprinting approach.

## Current EST sequencing projects and their use in gene expression studies

More than 8000 ESTs resulting from 12 subtractive and 3 normalized libraries from 6 tissues have been sequenced by MPI within the framework of the EU funded projects Aquafirst and Marine Genomics Europe. In addition, normalized tissue or stage specific libraries are currently being sequenced by Genoscope and JGI.

A new EST database is hosted by INRA on the Sigenae Information system, bringing together these new ESTs with all previously published ESTs and mRNAs. The 1758 obtained contigs plus 7518 singletons are now being used to construct an European *C. gigas* microarray slide.



## Conclusions and Future work

➔ Past and present work on EST sequencing in Europe and the USA provide a solid basis for gene expression studies, based on SSH (eg Huvet et al., 2004) and sequencing of normalized libraries (Tanguy et al., in prep), microarrays (Jenny et al., in press), SAGE, MPSS (Hedgecock et al., 2007) and other approaches (Saavedra and Bachère, 2006).

➔ OGC is currently seeking new opportunities to have the Pacific oyster genome sequenced. A conference proposal will soon put forward to the National Research Initiative Animal Genomes (USDA).

### References:

- Cunningham et al. (2006). New resources for marine genomics: Bacterial artificial chromosome libraries for the eastern and pacific oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*) Marine Biotechnology 8: 521-533.
- Gueguen et al. (2003). Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. Gene 303: 139-145.
- Hedgecock et al. (2005). The case for sequencing the Pacific oyster genome. Journal of Shellfish Research 24: 429-441.
- Hedgecock et al. (2007). Transcriptomic analysis of growth heterosis in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). PNAS 104(7): 2313-2318.
- Hubert and Hedgecock (2003). Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Genetics 168: 351-362.
- Huvet et al. (2004). The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. Gene 343(1): 211-220.
- Jenny et al. (2007). A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. Marine Biotechnology (in press)
- Saavedra and Bachere (2006). Bivalve genomics. Aquaculture 256: 1-14.
- Sauvage et al. Development of SNPs and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Submitted to Gene.
- Tanguy et al. A contribution of "Marine Genomic Europe" to the improvement of EST data in marine bivalves. In prep.
- Yu and Guo (2003). Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Biological. Bulletin 204, 327-338.



## Annexe 2

**« NPY signalling in the gonad of oyster *Crassostrea gigas*: involvement in summer mortality ? »**

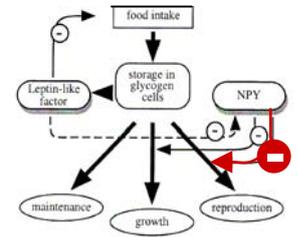


Charlotte Corporeau<sup>a</sup>, Elodie Fleury<sup>a,b</sup>, Jeanne Moal<sup>a</sup>, Pierre Boudry<sup>a</sup>, Pascal Favrel<sup>b</sup>, and Arnaud Huvet<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Ifremer, UMR M100 PE2M, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané; \* [ahuvet@ifremer.fr](mailto:ahuvet@ifremer.fr) / <sup>b</sup> Université de Caen, UMR M100 PE2M, 14032 Caen.

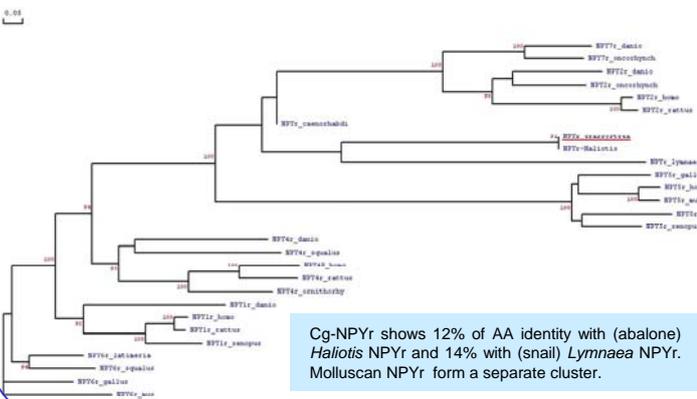
In summer, oysters suffer **mortality** that decimates this year about 60% of the population in France. We previously demonstrated a genetic basis for summer survival that allowed us to produce **resistant (R)** and **susceptible (S)** oyster families by divergent selection (Samain et al., 2007). At the physiological level, R families can survive summer mortality because they are reproductively less active than S families (Fleury et al., 2008).

In order to identify the molecular basis of the summer survival, a transcriptomic approach on R and S families was performed using microarray analysis and 34 differentially-expressed genes were identified between R and S in the gonad (Fleury et al., in prep). Among these genes, we found an EST encoding a **neuropeptide Y related receptor (Cg-NPYr)**. Due to NPY major role in the coordination of energy balance and reproduction in other species, we studied Cg-NPYr expression and regulation in the gonad to gain insight into its function and its putative role in summer mortality.

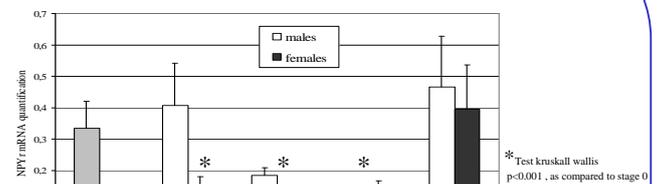


Schematic representation of the role of NPY in Lymnea (De Jong-Brink et al. 2001)

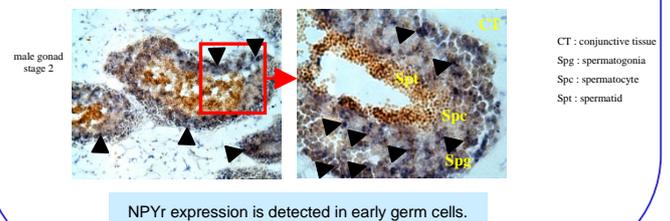
### Phylogenetic analysis of Cg-NPYr related proteins.



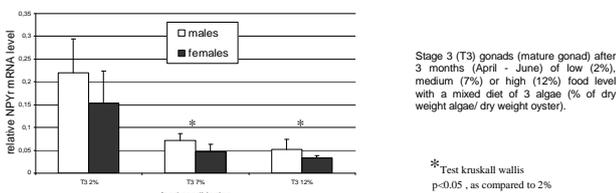
### Expression of Cg-NPYr in the gonad by real time PCR



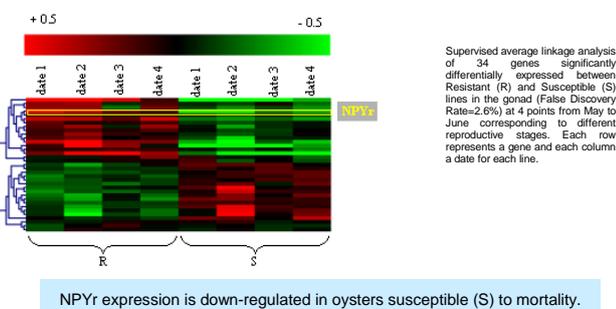
### Localization of Cg-NPYr in the gonad by *in situ* hybridization



### Effect of food availability on Cg-NPYr expression in the gonad



### Differential expression between R and S



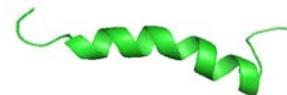
### What about a Cg-NPYr putative ligand? Cg-NPY...

**Crassostrea gigas preproNPY sequence.**

Signal peptide  
 M Q T S S L L A V L L V T L L S V W T V L G N D S L L P P N R P S R F S S P G L R Q  
 Cg-NPY C-terminal peptide  
 Y L K A L N D Y Y A I V G R P R F K R R D S E F S S Y G Q E P R S D G L L S S R D  
 R E D F A G P Q W W \*

G: Glycine for amidation, KR: putative proteolytic processing sites.

Swiss model:



### Alignment of NPY peptides

**Crassostrea** (NPY) --N S L P P N R P S R F S S P G L R Q Y L K A L N D Y Y A I V G R P R R a  
**Lymnaea** (NPY) --T E A M T P P O R E E E K N E L F K Y L K A L N E Y Y A I V G R P R R a  
**Alysia** (NPY) D N S E M L A P P R E E E T T A Q L R G Y L A L N E Y Y S I M G R P R R a  
**Drosophila** (NPF) ---S N S R P E K N D V N T M A D A Y K F Q D L D T Y G D R A I V R R a  
**Rattus** (NPY) ---Y P S K E D N G E D A P A E D M A R Y S A L R H I N L I T Q R Y a

Molluscs species

We cloned a full-length NPY cDNA. Corresponding mature NPY protein (38 AA) has several PRO/TYR conserved between NPY/F families, and shares 71% AA-identity with NPY-Lymnea. 3D-structure of NPY shows 50% identity with pancreatic hormone domains.

An **ancestral NPYr /NPY signalling** could exist in oysters and exerts its role **directly in the gonad** via a specific receptor.

In oysters susceptible (S) to mortality, the investment in reproduction is higher and NPYr is down-regulated, suggesting that NPYr/NPY signalling might exert an **inhibitory control of reproduction**, as already documented in Vertebrates. The development of GPCR deorphanization technology will be done to ascertain CgNPYr/CgNPY pairing. Functional studies will be carried out *in vivo* using RNAi invalidation.



---

# Bibliographie

---



## A

- Abele, D., Heise, K., Portner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. J. Exp. Biol. 205, 1831-1841.
- Adzhubei, A.A., Vlasova, A.V., Hagen-Larsen, H., Ruden, T.A., Laerdahl, J.K., Hoyheim, B., 2007. Annotated expressed sequence tags (ESTs) from pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in a searchable data resource. BMC Genomics 8, 209.
- Ahmad, I., Maria, V.L., Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to  $\beta$ -naphthoflavone. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 608, 16-28.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. Ecology Letters 7, 363-368.
- Amemiya, I., 1928. On the sex-change of the Japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. Proc. Imp. Acad. (Tokyo) 5, 284-286.
- Anderson, R.S., Patel, K.M., Roesijadi, G., 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. Developmental & Comparative Immunology 23, 443-449.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Mar. Environ. Res. 54, 585-589.

## B

- Bacca, H., 2007. Etude des voies métaboliques des sucres chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales., Thèse de doctorat. Université de Rennes I, pp. 173.
- Bachère, E., Boulo, V., Godin, P., Goggin, L., Hervio, D., LeGall, G., Morvan, A., Mialhe, E., 1991. In vitro chemiluminescence studies of marine bivalve defence mechanisms and responses against specific pathogens. Dev. Comp. Immunol. 15, S102.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol Rev 198, 149-68.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. Aquaculture 132, 17-32.
- Baker, P., 2004. Combining QTL and microarray data: the current state of play.
- Ballerini, C., Guerini, F.R., Rombolà, G., Rosati, E., Massacesi, L., Ferrante, P., Caputo, D., Figà Talamanca, L., Naldi, P., Liguori, M., Alizadeh, M., Momigliano-Richiardi, P., D'Alfonso, S.,

2004. HLA–multiple sclerosis association in Continental Italy and correlation with disease prevalence in Europe. *Journal of Neuroimmunology* 150, 178-185.
- Barbosa-Solomieu, V., Dégremont, L., Vazquez-Juarez, R., Ascencio-Valle, F., Boudry, P., Renault, T., 2004. Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Res.* 107, 47-56.
- Barillé, L., Prou, J., Héral, M., Razet, D., 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 212, 149-172.
- Baron, D., Houllatte, R., Fostier, A., Guiguen, Y., 2005. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod* 73, 959-66.
- Baron, D., Raharijaona, M., Houllatte, R., 2007. DNA microarrays. *IRBM* 28, 210-215.
- Bayne, B.L., Bubel, A., Gabbott, P.A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). *Marine Biology Letters* 3, 89-105.
- Benninger, P.G. & Le Pennec, M., 1991. Reproductive system. In: Shumway, S.E. (Ed.), *Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 177-223.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000a. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Marine Biotechnology* 2, 136-145.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000b. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 125, 359-369.
- Bertin, X., Chaumillon, E., Weber, N., Tesson, M., 2004. Morphological evolution and time-varying bedrock control of main channel at a mixed energy tidal inlet: Maumusson Inlet, France. *Marine Geology* 204, 187-202.
- Bobe, J., Montfort, J., Nguyen, T., Fostier, A., 2006. Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 39.
- Boettcher, K.J., Barber, B.J., Singer, J.T., 2000. Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the Roseobacter group and colonization of nonaffected animals by *Stappia stellulata*-like strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3924-3930.
- Bojkowska, K., Hamczyk, M.M., Tsai, H.W., Riggan, A., Rissman, E.F., 2008. Neuropeptide Y influences acute food intake and energy status affects NPY immunoreactivity in the female musk shrew (*Suncus murinus*). *Hormones and behavior* 53, 342-350.
- Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J., 2007. Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. *BMC Genomics* 8, 55.

- Boudry, P., Dégremont, L., Haffray, P., 2008. The genetic basis of summer mortality in Pacific oyster spat and potential for improving survival by selective breeding in France. In: Quae (Ed.), Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project, pp. 43.
- Bourlès, Y., 2004. Ecophysiologie de l'huître creuse : Analyse bioénergétique de la gamétogenèse sous trois conditions trophiques distinctes, DEA Biologie et Productions Animales. Université de Rennes 1, pp. 20.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147-57.
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., 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.
- Bremer, J., 1983. Carnitine: metabolism and function. *Physiological Reviews* 63, 1420-1480.
- Browne, R.A., 1982. The costs of reproduction in brine shrimp. *Ecology* 63, 43-47.
- Burke, R.D., 1983. The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae : stimulus and response. *Can. J. Zool.* 61, 1701-1719.
- Buroker, N.E., 1983. Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* 23, 271-279.

## C

- Cairns, M.C., Johnson, A.T., Talbot, J.K., Pemmasani, R.E., McNeill, B., Houeix, A., Sangrador-Vegas, A., Pottinger, T.G., 2008. A cDNA microarray assessment of gene expression in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a handling and confinement stressor. *Comp. Biochem. Physiol. D* 3, 51-66.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech* 57, 469-76.
- Carpio, Y., León, K., Acosta, J., Morales, R., Estrada, M.P., 2007. Recombinant tilapia Neuropeptide Y promotes growth and antioxidant defenses in African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Aquaculture* 272, 649-655.
- Chang, H., Brown, C.W., Matzuk, M.M., 2002a. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23, 787-823.
- Chang, W., Parra, M., Ji, C., Liu, Y., Eickelberg, O., McCarthy, T.L., Centrella, M., 2002b. Transcriptional and post-transcriptional regulation of transforming growth factor beta type II receptor expression in osteoblasts. *Gene* 299, 65-77.
- Chanrion, M., Negre, V., Fontaine, H., Salvétat, N., Bibeau, F., Mac Grogan, G., Mauriac, L., Katsaros, D., Molina, F., Theillet, C., Darbon, J.M., 2008. A gene expression signature that

- can predict the recurrence of tamoxifen-treated primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 14, 1744-1752.
- Chavez-Villalba, J., Cochard, J.C., Pennec, M., Barret, J., Enriquez-Diaz, M., Caceres-Martinez, C., 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 22, 721-731.
- Chavez-Villalba, J.E., Mingant, C., Cochard, J.C., Le Pennec, M., 2001. Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30, 1-12.
- Cheney, D.P., Elston, R.A., MacDonald, B.F., Kinnan, K., Suhrbier, A., 2001. Summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Influences of culture methods, site conditions, and stock selection, Baton Rouge LA.
- Cheney, D.P., MacDonald, B.F., 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, pp. 23.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Newell, R.E. (Ed.), *The eastern oyster: Crassostrea virginica*. Kennedy, Maryland Sea Grant College, pp. 299-333.
- Cheng, T.C., 2000. Cellular defense mechanisms in oysters. In: Biotechnology, R.a.i.M. (Ed.), *Immunology and Pathology*, Plymouth UK, pp. 43-83.
- Chu, F.L.E. Defense mechanisms in marine bivalves. In: Biotechnology, R.a.i.M. (Ed.), *Immunology and Pathology*, Plymouth UK, 2000, pp. 1-42.
- Clelland, E., Kohli, G., Campbell, R.K., Sharma, S., Shimasaki, S., Peng, C., 2006. Bone morphogenetic protein-15 in the zebrafish ovary: complementary deoxyribonucleic acid cloning, genomic organization, tissue distribution, and role in oocyte maturation. *Endocrinology* 147, 201-9.
- Coleman, N., 1986. A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing the species into Victoria, Australia., Queescliff, Victoria, Australia.
- Comps, M., 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *Disease processes in marine bivalve molluscs*.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674-6.
- Consortium, H.G.S., 2006. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 1010-1038.
- Consortium, I.M.S.G., 2008. Refining genetic associations in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 7, 567-569.

- Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., Mathieu, M., 2005. Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgol. Mar. Res.* 59, 286-300.
- Courtney-Smith, L., Azumi, K., Nonaka, M., 1999. Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology* 42, 107-120.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Van Engelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., *et al.*, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-7.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M.R., 2004. Role of the oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progr. in Neuro-Psychophar. & Biol. Psy.* 40, 22-35.
- Cui, Y., Jean, F., Thomas, G., Christian, J.L., 1998. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Embo J* 17, 4735-43.

## D

- Darvasi, A., 2003. Genomics: Gene expression meets genetics. *Nature* 422, 269-70.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *Febs J* 272, 5635-52.
- De Almeida, E.A., Dias Bainsy, A.C., de Melo Loureiro, A.P., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Machado Garcia, C.C., Manso Prado, F., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Barbosa Brochini, C., Gracioso Martins, A.M., Gennari de Medeiros, M.H., P, D.M., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146, 588-600.
- De Jong-Brink, M., ter Maat, A., Tensen, C.P., 2001. NPY in invertebrates: molecular answers to altered functions during evolution. *Peptides* 22, 309-315.
- Deaton, L.E., 2001. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa* : rapid accumulation of betaine and alanine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 260, 185-197.
- Dégremont, L., 2003. Genetic basis of summer mortality and relationship with growth and juvenile Pacific cupped oysters *Crassostrea gigas*, Thèse de l'université de Caen, pp. 322.
- Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.F., Boudry, P., 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.

- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E., Boudry, P., 2007. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 262, 41-53.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.F., 2006a. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, 571-582.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C., Samain, J.F., 2006b. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567-576.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species--*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J Exp Biol* 206, 3053-64.
- Deménaïs, F., Martínez, M., Lathrop, M., 1996. Méthodes statistiques pour identifier les gènes dans les maladies multifactorielles. *Annales de l'institut Pasteur* 7, 3-12.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- Deslous-Paoli, J., Héral, M., Berthome, J.P., Razet, D., Garnier, J., 1981. Natural reproduction of *Crassostrea gigas* Thunberg in Marennes-Oleron basin 1979 and 1981 : Biochemical and energetics aspects. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.* 45, 319-327.
- Devauchelle, N., Boussaid, B., Le Penneç, G., Salain, G., Dorange, G., 1998. Organization of the genital tract of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, International congress on invertebrate reproduction and development.
- Didier, G., Brezellec, P., Remy, E., Henaut, A., 2002. GeneANOVA--gene expression analysis of variance. *Bioinformatics* 18, 490-1.
- Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., Leduc, R., 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270, 10618-24.
- Dufour, S., Weltzien, F.A., Sebert, M.E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., Pasqualini, C., 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann N Y Acad Sci* 1040, 9-21.

## E

- Eckelbarger, K.J., Young, C.M., 1999. Ultrastructure of gametogenesis in a chemosynthetic mytilid bivalve (*Bathymodiolus childressi*) from a bathyal, methane seep environment (northern Gulf of Mexico). *Marine Biology* 135, 635-646.

- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-8.
- Elis, S., Batellier, F., Couty, I., Balzergue, S., Martin-Magniette, M.L., Monget, P., Blesbois, E., Govoroun, M.S., 2008. Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen. *BMC Genomics* 9, 110.
- Encomio, V.G., 1998. Respiratory and metabolic response to sulfide and hypoxia in the marine echiuran worm, *Urechis caupo*. San Francisco University, PhD thesis, 74p.
- Enriquez-Diaz, M., 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas*., IFREMER. Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, pp. 223.
- Enriquez-Diaz, M., Pouvreau, S., Fabioux, C., Le Coguc, Y., Cochard, J.C., Le Pennec, M., 2003. Reproductive strategy : Variability of reproductive pattern in two populations genetically determined of *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 22, 328.
- Erickson, G.F. & Shimasaki, S., 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 9.
- Erkan, M. & Sousa, M., 2002. Fine structural study of the spermatogenic cycle in *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae). *Tissue Cell* 34, 262-72.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J Evol Biol* 17, 342-56.
- Escoubas, J.M., Briant, L., Montagnani, C., Hez, S., Devaux, C., Roch, P., 1999. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Lett* 453, 293-8.

## F

- Fabioux, C., 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas* : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion, Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, pp. 196.
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A., 2009. In vivo RNA interference in oyster: vasa silencing inhibits germ cell development. Soumis à FEBS letter.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458-470.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C., Le Pennec, M., 2004b. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 592-8.

- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004a. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 897-904.
- Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, J.R.G., Foster, W.S., 1972. Oyster herpes-type virus. *Science* 178, 759-760.
- Feng, S.Y., 1988, Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. In: Publ., A.F.S.S. (Ed.), *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs.*, Bethesda, Maryland, pp. 153-168.
- Fernandez-Fernandez, R., Martini, A.C., Navarro, V.M., Castellano, J.M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2006. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 254-255, 127-32.
- Fisher, W.S., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehelin, M. (Ed.), *Immunity in Invertebrates*. Heidelberg, Springer Verlag, , pp. 25-35.
- Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P., Huvet, A., 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* 410, 187-96.
- Ford, S. & Borrero, F.J., 2001. Epizootiology and Pathology of Juvenile Oyster Disease in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 141-154.
- Ford, S.&Haskin, H.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.
- Franchini, A. & Ottaviani, E., 2000. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF-beta1. *Tissue Cell* 32, 312-21.
- Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdain, P., Mathieu, M., 2008. Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell* 40, 251-260.
- Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burrenson, E.M., Reece, K.S., 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis. Aquat. Org.* 63, 33-41.
- Fujimori, T. & Abe, H., 2002. Physiological role of free D- and L- alanine in the crayfish *Procambarus clarkii* with special reference to osmotic and anoxic stress responses. *Comp. Biochem. Physiol., A* 131, 893-900.

## G

- Gabbott, P.A., 1975. Storage cycle in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. Aberdeen University Press.

- Gabbott, P.A. & Whittle, M.A., 1986. Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L. II: Seasonal changes in glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B : Comparative biochemistry* 83, 197-207.
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006b. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol* 20, 536-47.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T., 2006a. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* 22, 1-14.
- Gagne, F. & Blaise, C., 2003. Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 136, 117-25.
- Galloway, S.M., Gregan, S.M., Wilson, T., McNatty, K.P., Juengel, J.L., Ritvos, O., Davis, G.H., 2002. Bmp15 mutations and ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 191, 15-8.
- Galtsoff, P.S., 1930. The role of chemical stimulation in the spawning reactions of *Ostrea virginica* and *Ostrea gigas*. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 16, 555-559.
- Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica*., *Fisheries bulletin*, pp. 480.
- Gautier, C., Levacher, C., Saez, J.M., Habert, R., 1997. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits steroidogenesis in dispersed fetal testicular cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 131, 21-30.
- Gérard, A., 1998. Avancées récentes sur la reproduction des huîtres. *Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ.* 26, 115-119.
- Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launay, S., Heurtebise, C., Ledu, C., Phelipot, P., 1995. Controlling gametogenesis in flat and japanese oysters. Relationship between reproduction and genetics. In: FREMER, P.F. (Ed.), *La Reproduction Naturelle et Controlée des Bivalves Cultivés en France*, pp. 99-112.
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.C., Gueguen, Y., Bachere, E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1089-97.
- Gotzes, F., Balfanz, S., Baumann, A., 1994. Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors Channels* 2, 131-41.
- Gouletquer, P. Natural reproduction cycle of the japanese oyster *Crassostrea gigas*., IFREMER, Nantes, 1997.
- Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Taillade, S., 1998. Summer mortality of the cupped oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Marennes Oléron (France). *ICES, Lisbon CM (CC)* 14, 14-20.

- Govoroun, M., Le Gac, F., Guiguen, Y., 2006. Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC Genomics* 7, 196.
- Gray, A.M. & Mason, A.J., 1990. Requirement for activin A and transforming-growth-factor-beta 1 pro-regions in homodimere assembly. *Science* 247, 1328-1330.
- Greenway, S.C. & Storey, K.B., 2000. Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. *J. Comp. Physiol. B* 170, 285-293.
- Gregory, T.R., 2008. Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>.
- Grizel, H., 1974. Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *Comptes rendus de l'académie des sciences* 279, 783-785.
- Grizel, H., 1996. Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 15, 401-408.
- Grizel, H. & Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. CIEM* 47, 399-403.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E., Escoubas, J.M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139-45.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution* 52, 394-402.

## H

- Hardie, D.G., 1992. Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. *BBA* 1123, 231-238.
- Hardie, D.G., 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144, 5179-5183.
- Hashimoto, O., Moore, R.K., Shimasaki, S., 2005. Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5426-31.
- Hawkins, A.J.S. & Bayne, B.L.: Physiological interrelations, and the regulation of production. In: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. In: EM, G. (Ed.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, Amsterdam, 1992, pp. 171-222.
- Hedgecock, D., Gaffney, P., M., Gouilletquer, P., Guo, X., Reece, K., Warr, G., W., 2005. The case for sequencing the Pacific oyster genome. *Journal of Shellfish research* 24, 429-41.

- Hedgecock, D., Lin, J.Z., DeCola, S., Haudenschield, C.D., Meyer, E., Manahan, D.T., Bowen, B., 2007. Transcriptomic analysis of growth heterosis in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2313-8.
- Héral, M., 1985. L'ostréiculture française traditionnelle. Lavoisier.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 120, 437-448.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F., Favrel, P., Cunningham, C., 2005b. Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway. *Febs J* 272, 3424-40.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F.M., Favrel, P., Cunningham, C., 2005a. Structural and functional evidences for a type 1 TGF-beta sensu stricto receptor in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggest conserved molecular mechanisms controlling mesodermal patterning across bilateria. *Mech Dev* 122, 695-705.
- Herpin, A., Lelong, C., Favrel, P., 2004. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 28, 461-85.
- Heude-Berthelin, C., 2000. Etude du métabolisme du glycogène chez l huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. thèse de Doctorat de l'Université de Caen, pp. 156.
- Hine, P.M., 1996. Southern hemisphere mollusc diseases and an overview of associated risk assessment problems. *Rev. Sci. Tech.* 15, 563-577.
- Hinsch, G.W., 1993. Comparative organization and cytology of Sertoli cells in invertebrates. FL. ed.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., En préparation. Lines selected to be resistant or sensitive to summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* displayed difference in reproductive investment.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremon, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211-20.

## I

- Ingman, W.V. & Robertson, S., 2002. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays* 24, 904-914.
- Ivanovici, A.M., 1980. Adenylate energy charge : an evaluation of applicability to assessment of pollution effects and directions for future research. *Cons. Int. Explor. Mer.* 179, 23-28.

## **J**

- Jansen, R.C. & Nap, J.P., 2001. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet* 17, 388-91.
- Javelaud, D. & Mauviel, A., 2004. Transforming growth factor beta : smad signaling and roles in physiopathology. *Pathologie Biologie* 52, 50-54.
- Jenny, M.J., Chapman, R.W., Mancina, A., Chen, Y.A., McKillen, D.J., Trent, H., Lang, P., Escoubas, J.M., Bachere, E., Boulo, V., Liu, Z.J., Gross, P.S., Cunningham, C., Cupit, P.M., Tanguy, A., *et al.*, 2007. A cDNA microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Mar Biotechnol* (NY) 9, 577-91.
- Jo, P.G., Choi, Y.K., Choi, C.Y., 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147, 460-9.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P., 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551-556.
- Josso, N. & Di Clemente, N., 1999. TGF-beta Family Members and Gonadal Development. *Trends Endocrinol Metab* 10, 216-222.
- Josso, N., Racine, C., di Clemente, N., Rey, R., Xavier, F., 1998. The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 145, 3-7.

## **K**

- Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F., 1996. The Eastern oyster *Crassostrea virginica* Maryland Sea Grant College, Maryland, pp. 733.
- Kinnula, V.L., Crapo, J.D., Raivio, K.O., 1995. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Laboratory Invest* 73, 3-19.
- Knight, P.G., Glister, C., 2003. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 78, 165-83.
- Koganezawa, A., 1975. Present status of studies on the mass mortality of cultural oysters in Japan and its prevention. Proc. Third Us-Japan meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan, Oct 1973 29-34.
- Kohli, G., Clelland, E., Peng, C., 2005. Potential targets of transforming growth factor-beta1 during inhibition of oocyte maturation in zebrafish. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 53.
- Kohli, G., Hu, S., Clelland, E., Di Muccio, T., Rothenstein, J., Peng, C., 2003. Cloning of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and its type II receptor from zebrafish ovary and role of TGF-beta 1 in oocyte maturation. *Endocrinology* 144, 1931-41.

Krämer, D.K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P.M., Krook, A., 2007. Role of AMPK and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem.* 282, 19313-19320.

## L

Labreuche, Y., 2006. Caractérisation de la virulence de *Vibrio aestuarianus* pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*., IFREMER. Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, pp. 287.

Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect* 8, 2715-24.

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 2001a. 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, 139-45.

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001b. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol* 67, 2304-9.

Lacoste, A., Malham, S.A., Cueff, A., Jalabert, F., Gelebart, F., Poulet, S.A., 2001c. Evidence for a form of adrenergic response to stress in the mollusc *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology* 204, 1247-1255.

Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001d. Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gen Comp Endocrinol* 122, 181-8.

Lacoste, A., Malham, S.K., Gelebart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 26, 1-9.

Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol* 15, 225-240.

Lambert, C., Soudant, P., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F., Huvet, A., Samain, J.-F., 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* 270, 276-288.

Landsberg, J.H., 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.* 10, 113-390.

Lang, P., Langdon, C.J., Camara, M.D., 2008. Predicting the resistance of adult pacific oysters (*Crassostrea gigas*) to summer mortality. *Journal of Shellfish research* 27, 470-470.

Lango-Reynoso, F., 1999. Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, pp. 139.

- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-199.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P.J., 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. *Invertebr. Reprod. Dev.* 36, 141-144.
- Lau, P.S. & Wong, H.L., 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* 46, 1563-1572.
- Laudien, J., Schieck, D., Brey, T., Portner, H.O., Arntz, W.E., 2002. Survivorship of juvenile clams *Donax serra* (Bivalvia, Donacidae) exposed to severe hypoxia and hydrogen sulphide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 271, 9-23.
- Le Cointre, G. & Le Guyader, G., 2001: Classification phylogénétique du vivant., Belin ed.
- Le Deuff, R.M., Nicolas, J.L., Renault, T., Cochenec, N., 1994. Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 14, 69-72.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L., Berthe, F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea giags* mortality events. *Aquatic Living resources* 15, 251-258.
- Leclerc, C., Guerrier, P., Moreau, M., 2000. Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in meiosis and fertilization in the bivalve molluscs *Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*. *Biol. Cell.* 92, 285-299.
- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quere, H., Rodet, F., Dubos, M.P., Favrel, P., 2007. Cg-TGF-beta, a TGF-beta/activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev Comp Immunol* 31, 30-8.
- Lelong, C., Mathieu, M., Favrel, P., 2000. Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Eur J Biochem* 267, 3986-93.
- Li, K., Osada, M., Mori, K., 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Sci.* 66, 502-508.
- Lin, W., 2004. Applications de la technologie des Puces à ADN à l'étude de la différenciation méiotique et des mécanismes de recombinaison chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*., Thèse de doctorat. Université de Paris VI, pp. 243.
- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C.P., Toranzo, A.E., 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65, 15-29.
- Lubet, P., 1976. Ecophysiologie de la reproduction chez les mollusques lamellibranches. *Haliotis* 7, 49-55.

- Lubet, P., 1991. Bases biologiques de la culture des mollusques. In: Barnabé, G. (Ed.), Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, pp. 99-212.
- Luiselli, L., Capula, M., Shine, R., 1996. Reproductive output, costs of reproduction and ecology of the smooth snake, *Coronella austriaca*, in the eastern Italian Alps. *Oecologia* 106, 100-110.
- Lyng, H., Badiee, A., Svendsrud, D.H., Hovig, E., Myklebost, O., Stokke, T., 2004. Profound influence of microarray scanner characteristics on gene expression ratios: analysis and procedure for correction. *BMC Genomics* 5, 10.

## M

- Ma, L.J., Jha, S., Ling, H., Pozzi, A., Ledbetter, S., Fogo, A.B., 2004. Divergent effects of low versus high dose anti-TGF-beta antibody in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Kidney Int.* 65, 106-115.
- MacKenzie, S., Balasch, J.C., Novoa, B., Ribas, L., Roher, N., Krasnov, A., Figueras, A., 2008. Comparative analysis of the acute response of the trout, *O. mykiss*, head kidney to in vivo challenge with virulent and attenuated infectious hematopoietic necrosis virus and LPS-induced inflammation. *BMC Genomics* 9, 141.
- Mackin, J.G., 1961. Mortalities of oysters. *Proc. Nat. Shellfish Assoc* 50, 40-51.
- Magni, P., Motta, M., Martini, L., 2000. Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regul Pept* 92, 51-6.
- Mallet, A.L., Carever, C.E.A., Freeman, K.R., 1990. Summer mortality of the blue mussel in eastern Canada: spatial, temporal, stock and age variation. *Marine Ecology Progress Series* 67, 35-41.
- Mallet, A.L. & Myrand, B.: The culture of the blue mussel in Atlantic Canada. In: Cold-water aquaculture in Atlantic Canada. In: AD, B. (Ed.), Canadian Institute for Research on Regional Development, 1995, pp. 255-296.
- Manduzio, H., Cosette, P., Gricourt, L., Jouenne, T., Lenz, C., Andersen, O.K., Leboulenger, F., Rocher, B., 2005. Proteome modifications of blue mussel (*Mytilus edulis* L.) gills as an effect of water pollution. *Proteomics* 5, 4958-63.
- Matsumoto, T., Nakamura, A., Mori, K., Kayano, T., 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zool. Sci.* 20, 37-42.
- Maurer, D. & Comps, M., 1986; Mortalités estivales de l'huitre *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. In: Vivares, C.P., Bonami, J.R. and Jaspers, E. (Eds.), Pathology in marine aquaculture. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 29-41.
- McPherron, A.C. & Lee, S.J., 1993. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268, 3444-9.

- Memon, M.A., Anway, M.D., Covert, T.R., Uzumcu, M., Skinner, M.K., 2008. Transforming growth factor beta (TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3) null-mutant phenotypes in embryonic gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 294, 70-80.
- Mendez, C., Alcantara, L., Escalona, R., Lopez-Casillas, F., Pedernera, E., 2006. Transforming growth factor beta inhibits proliferation of somatic cells without influencing germ cell number in the chicken embryonic ovary. *Cell Tissue Res* 325, 143-9.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., al., 2007. The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* 318, 245 - 250.
- Mertens, I., Vandingenen, A., Meeusen, T., De Loof, A., Schoofs, L., 2004. Postgenomic characterization of G-protein-coupled receptors. *Pharmacogenomics* 5, 657-72.
- Meyers, T.R., 1981. Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: Adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). *Aquaculture* 22, 305-330.
- Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M., Escoubas, J.M., 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett* 561, 75-82.
- Montagnani, C., Labreuche, Y., Escoubas, J.M., 2008. Cg-IkappaB, a new member of the IkappaB protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 32, 182-90.
- Moore, R.K., Erickson, G.F., Shimasaki, S., 2004. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Trends Endocrinol Metab* 15, 356-61.
- Myrand, B. & Gaudreault, J., 1995. Summer mortality of blue mussels (*Mytilus edulis Linnaeus*, 1758) in the Magdalen Islands (southern Gulf of St. Lawrence). *Journal of Shellfish Research* 14, 395-404.
- Myrand, B., Guderley, H., Himmelman, J., 2000. Reproduction and summer mortality of blue mussels (*Mytilus edulis L.*) in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Mar Ecol Prog Ser* 197, 193-207.
- Myrand, B., Tremblay, R., Sévigny, J.M., 2002. Selection Against Blue Mussels (*Mytilus edulis L.*) Homozygotes Under Various Stressful Conditions. *J. Hered.* 93, 238-248.

## N

- Nachtigal, M.W. & Ingraham, H.A., 1996. Bioactivation of Mullerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7711-6.

- Naimi, A., Martinez, A.S., Specq, M.L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M., Sourdain, P., 2008. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.
- Nebert, D.W. & Vesell, E.S., 2004. Advances in pharmacogenomics and individualized drug therapy: exciting challenges that lie ahead. *Eur J Pharmacol* 500, 267-80.
- Neuer, A., Spandorfer, S.D., Giraldo, P., Jeremias, J., Dieterle, S., Korneeva, I., Liu, H.C., Rosenwaks, Z., Wtkin, S.S., 1999. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 7, 10-16.

## Q

- Olafsen, J.A., Fletcher, T.C., Grant, P.T., 1992. Agglutinin activity in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 123-138.
- Oliver, L.M., Fisher, W.S., Ford, S.E., Calvo, L.M., Burreson, E.M., Sutton, E.B., Gandy, J., 1998. *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. *Dis. Aquat. Organ.* 34, 51-61.
- Orlenko, A.N., 1994. Giant oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Mytiliformes, Crassostreidae) as an acclimatizable species and stages of its transplantation to the Black Sea. *Zoologeskij Zurna* 73, 51-54.
- Otsuka, F. & Shimasaki, S., 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8060-5.

## P

- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17, 477-498.
- Parache, A., 1989. Growth performance of oyster *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas* reared in Arcachon Bay between 1950 and 1986: First results. *Haliotis* 19, 227-236.
- Partridge, L. & Prowse, N., 1997. The effects of reproduction on longevity and fertility in male *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 43, 501-512.
- Peng, C., Clelland, E., Tan, Q., 2008. Potential role of bone morphogenetic protein-15 in zebrafish follicle development and oocyte maturation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.
- Perez, T., Garrabou, J., Sartoretto, S., Harmelin, J.G., Francour, P., Vacelet, J., 2000. Mass mortality of marine invertebrates: an unprecedented event in the Northwestern Mediterranean. *Life Sciences* 323, 853-865.

Prieur, D., 1971. Recherches bibliographiques sur le développement embryonnaire des mollusques bivalves. Mémoire de DEA d'Océanographie Biologique,, Faculté des Sciences de Paris, pp. 33.

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

## **R**

Raillard, O., Deslous-Paoli, J.M., Héral, M., Razet, D., 1993. Modelling growth and feeding of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in Marennes Oleron Bay (France). *Oceanol. Acta* 16, 73-82.

Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., Chollet, B., 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., Delsert, C., 2000. Development of a PCR procedure for the detection of an herpes-like virus infecting oysters in France. *J Virol Meth* 88, 41-50.

Renault, T. & Novoa, B., 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources* 17, 397-409.

Roebroek, A.J., Creemers, J.W., Pauli, I.G., Bogaert, T., Van de Ven, W.J., 1993. Generation of structural and functional diversity in furin-like proteins in *Drosophila melanogaster* by alternative splicing of the Dfur1 gene. *Embo J* 12, 1853-70.

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., L.O, G.-M., Lopez, J.L., 1992b. Influence of seasonal environment changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 155, 249-262.

Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., Abad, M., Sanchez, J., 1992a. Seasonal variation in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Mar. Biol.* 112, 67-74.

## **S**

Saha, N., Kharbuli, Z.Y., Bhattacharjee, A., Goswami, C., Haussinger, D., 2002. Effect of alkalinity (pH 10) on ureogenesis in the air-breathing walking catfish, *Clarias batrachus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 132, 353-364.

Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., *et al.*, 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster

- (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. *Aquaculture* 268, 227-243.
- Samain, J.F. & McCombie, H., 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project., Quae ed.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A., Sarker, S., 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 338-340.
- Sauvage, C., 2008. Développement de marqueurs moléculaires liés à la résistance à la mortalité estivale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Approche QTL., Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, pp. 216.
- Sauvage, C., Bierne, N., Lapegue, S., Boudry, P., 2007. Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* 406, 13-22.
- Sauvage, C., Boudry, P., Lapegue, S., 2008. Identification and characterization of 18 novel polymorphic microsatellite makers derived from expressed sequence tags in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Resources*.
- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2007. A novel transforming growth factor-beta superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Biol* 301, 266-75.
- Schneider, J.E., 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 81, 289-317.
- Schneider, J.E., 2006. Metabolic and hormonal control of the desire for food and sex: implications for obesity and eating disorders. *Horm Behav* 50, 562-71.
- Schulz, C., Kiger, A.A., Tazuke, S.I., Yamashita, Y.M., Pantalena-Filho, L.C., Jones, D.L., Wood, C.G., Fuller, M.T., 2004. A misexpression screen reveals effects of bag-of-marbles and TGF beta class signaling on the Drosophila male germ-line stem cell lineage. *Genetics* 167, 707-23.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, Sodergren, E., Weinstock, G.M., Davidson, E.H., Cameron, R.A., Gibbs, R.A., Angerer, R.C., Angerer, L.M., Arnone, M.I., Burgess, D.R., Burke, R.D., al., e., 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314, 941-952.
- Shimasaki, S., Moore, R.K., Erickson, G.F., Otsuka, F., 2003. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reprod Suppl* 61, 323-37.
- Shimasaki, S., Moore, R.K., Otsuka, F., Erickson, G.F., 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25, 72-101.
- Shimasaki, S., Zachow, R.J., Li, D., Kim, H., Iemura, S., Ueno, N., Sampath, K., Chang, R.J., Erickson, G.F., 1999. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7282-7.
- Smith, P.J., Ozaki, H., Fujio, Y., 1986. No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshwater res.* 20, 569-574.

- Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6, 197-208.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P., 1997. Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquatic Living Resources* 10, 177-185.
- Soletchnik, P., Lambert, C., Costil, K., 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research* 24, 197-208.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P., 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources* 12, 131-143.
- Soudant, P., Lambert, C., Choquet, G., Ford, S., Paillard, C., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Soletchnik, P., Joly, J.-P., Ropert, M., Huvet, A., Samain, J.F., 2002. Relationships between summer mortalities and defense mechanisms in families of *Crassostrea gigas* reared in different environmental conditions. *J. Shellfish Res.* 21, 407.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Steele, S. & Mulcahy, M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 70, 673-686.
- Suzuki, Y., Cherian, M.G., 2000. Effect of ethanol on brain metallothionein in transgenic mice. *Alcohol Clin Exp Res* 24, 315-21.

## T

- Tahtouh, M., Croq, F., Vizioli, J., Sautiere, P.E., Van Camp, C., Salzet, M., Daha, M.R., Pestel, J., Lefebvre, C., 2008. Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. *Molecular Immunology* In Press, Corrected Proof.
- Takada, T. & Nakajima, H., 1992. An analysis of life history evolution in terms of the density-dependent Lefkovich Matrix model. *Math. Biosci.* 112, 115-176.
- Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra, C., Pina, B., Bachere, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., Boutet, I., Cancela, L., Dossat, C., Favrel, P., Huvet, A., *et al.*, 2008. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* 408, 27-36.

- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *Febs J* 272, 390-403.
- Tanguy, A., Guo, X., Ford, S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oysters. *Gene* 18, 121-131.
- Tanguy, A. & Moraga, D., 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene* 273, 123-130.
- Taylor, F.J., Taylor, N.J., Walsby, J.R., 1985. A bloom of the planktonic diatom, *Cerataulina pelagica*, off the coast of northeastern New Zealand in 1983, and its contribution to an associated mortality of fish and benthic fauna. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*. 70, 773-795.
- Thomson, J.M., 1952. The acclimatization and growth of the Pacific oyster (*Gryphaea gigas*) in Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 3, 64-73.
- Thomson, J.M., 1958. The naturalization of the pacific oyster in Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 10, 144-149.
- Torreilles, J., Guerin, M.C., Roch, P., 1996. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *C. R. Acad. Sci* 319.
- Travers, M.A., Le Goic, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.*
- Tremblay, R., Myrand, B., Guderley, H., 1998c. Thermal sensitivity of organismal and mitochondrial oxygen consumption in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.), to summer mortality. *J.Shellfish Res.* 17, 141-152.
- Tremblay, R., Myrand, B., Sevigny, J.M., 1998b. Genetic characterization of wild and suspension-cultured blue mussels (*Mytilus edulis* Linneaus, 1758) in the Magdalen Islands (Southern Gulf of St. Lawrence, Canada). *J.Shellfish Res.* 17, 1191-1202.
- Tremblay, R., Myrand, B., Sevigny, J.M., Blier, P., Guderley, H., 1998a. Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 221, 27-58.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-21.

## V

- Van Beusekom, J. & De Jonge, V., 2002. Long-term changes in Wadden Sea nutrient cycles: importance of organic matter import from the North Sea. *Hydrobiologia* 475, 185-194.
- Van Engelsdorp, D., Cox Foster, D., Frazier, M., Ostiguy, N., Hayes, J., 2006. Investigations into the causes of sudden and alarming colony losses experienced by beekeepers in the fall of 2006. Fall Dwindle Disease: A preliminary report.
- Venier, P., De Pittà, C., Pallavicini, A., Marsano, F., Varotto, L., Romualdi, C., Dondero, F., Viarengo, A., Lanfranchi, G., 2006. Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutat Res* 602, 121-134.
- Ventilla, R.F., 1984. Recent developments in the Japanese oyster culture industry. *Advances in Marine Biology* 21, 2-54.
- Vitt, U.A., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J., 2001a. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol* 15, 681-94.
- Vitt, U.A. & Hsueh, A.J., 2001b. Stage-dependent role of growth differentiation factor-9 in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 183, 171-7.

## W

- Wade, G.N. & Jones, J.E., 2004. Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R1277-96.
- Wagener, A., Fickel, J., Schon, J., Fritzenkotter, A., Goritz, F., Blottner, S., 2005. Seasonal variation in expression and localization of testicular transforming growth factors TGF $\beta$ -1 and TGF $\beta$ -3 corresponds with spermatogenic activity in roe deer. *J Endocrinol* 187, 205-15.
- Waller, T.R., 1981. Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linné. *Smithson.*
- Wang, Y., Salmon, A.B., Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 36, 1349-59.
- Wikfors, G., 2005. A review and new analysis of trophic interactions between *Prorocentrum minimum* and clams, scallops, and oysters. *Harmful Algae* 4, 585-592.
- Willett, K.L., Wilson, C., Thomsen, J., Porter, W., 2000. Evidence for and against the presence of polynuclear aromatic hydrocarbon and 2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin binding proteins in the marine mussels, *Bathymodiolus* and *Modiolus modiolus*. *Aquat. Toxicol.* 48, 51-64.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massague, J., 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341-7.

## X

Xue, Q. & Renault, T., 2001. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Dev Comp Immunol* 25, 187-94.

## Y

Yang, C., Zhang, J., Li, F., Ma, H., Zhang, Q., Jose Priya, T.A., Zhang, X., Xiang, J., 2008. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 564-574.

Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C.N., Jr., 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 85.

## Z

Zhang, D.M., Yoshimatsu, T., Furuse, M., 2005. Effects of L-carnitine enrichment on the population growth, egg ratio and body size of the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Aquaculture* 248, 51-57.

Zhang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Wang, H., Gao, Q., Xu, W., 2007. Molecular cloning and characterization of a thioester-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology* 44, 3492-3500.

---

# Liste des figures et tableaux

---



Figure 1: Schéma des interactions Environnement-Pathogènes-Individu .	p. 4
Figure 2 : IRM d'un patient atteint de sclérose en plaques	p.7
Figure 3 : Abeilles <i>Apis mellifera</i> s, s'hydratant d'eau potentiellement polluée.	p.10
Figure 4 : Manifestation de la mortalité, conséquence des températures anormalement élevées de l'été 1999.	p. 11
Figure 5 : Moules bleues ( <i>Mytilus edulis</i> ).	p.13
Figure 6 : Taux de mortalités des huîtres de 1 an et de 2 ans le long du littoral françaises entre 1995 et 2004 (1 an) et 1993 et 2004 (2 ans).	p.16
Figure 7 : Classification phylogénétique des Métazoaires.	p.23
Figure 8 : L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> ouverte, valve droite enlevée.	p.24
Figure 9: Anatomie générale de l'huître américaine <i>Crassostrea virginica</i> dans sa valve gauche.	p.25
Figure 10 : Organisation du système circulatoire chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i> .	p.26
Figure 11 : Organisation des tubules gonadiques mâles et femelles de <i>Crassostrea gigas</i> pendant la gamétogenèse.	p.28
Figure 12 : Chronologie des grandes étapes du cycle de reproduction de <i>Crassostrea gigas</i> en milieu tempéré.	p.29
Figure 13 : Cycle de développement de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> .	p.31
Figure 14 : Variations saisonnières du tissu de réserve dans la région manteau-gonade.	p.33
Figure 15 : Les différents types hémocytaires chez <i>Crassostrea gigas</i> , identifiés par microscope électronique à transmission.	p.34
Figure 16 : Respiration moyenne en fonction de la température et du stade de maturation des huîtres.	p.38
Figure 17 : Relation entre la mortalité estivale cumulée et les débits moyens en baie de Veys des chenaux de Carantan et Isigny .	p.40
Figure 18 : Phénomène d'envasement de zone ostréicole	p.41
Figure 19 : Mortalité comparée entre les élevages à 0-15 cm et 50-70 cm sur le site atelier de Perquis dans le sud du Bassin de Marennes Oléron.	p.42
Figure 20 : Particules d'un herpes virus « OsHV-1 » observés à partir de larves <i>C. gigas</i> .	p.45
Figure 21 : Détection d'Herpès OsHV-1 et cas de mortalités de naissain déclarés de 2001 à 2005.	p.46
Figure 22 : Mortalités cumulées observées sur des huîtres traitées ou non par un antibiotique (chloramphénicol).	p.47

Figure 23 : Plan de croisement hiérarchisé par les mâles des 3 séries pour la constitution des familles de 1ères générations.	p.50
Figure 24 : Mortalités moyennes obtenues lors d'un suivi de juillet à octobre 2005 sur le site de Ronces, de la 4ème génération d'huîtres Résistantes (R) et Sensibles (S).	p.53
Figure 25 : Evolution de la respiration au cours de la ponte.	p.55
Figure 26 : Evolution du taux moyen de glucides chez des huîtres conditionnées en milieu contrôlé pendant un an et soumis à deux régimes alimentaires CN1 et CN3.	p.56
Figure 27 : Evolution du bilan énergétique d'une huître creuse au cours de la gamétogenèse.	p.57
Figure 28 : Quantité d'ARNm de Hexokinase (HK), Phosphoglucomutase (PGM), Pyruvate kinase (PK), Phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK), Glycogen Synthase (GS), et Glycogen Phosphorylase (GP) chez les huîtres Résistantes et Sensibles S au cours de la période de reproduction.	p.57
Figure 29 : Capacité moyenne de production de radicaux libres oxygénés (RLO) en unité arbitraire par granulocyte, mesurés sur des huîtres Résistantes et Sensibles de mars à Septembre 2003.	p.59
Figure 30 : Identification et classification par catégories fonctionnelles de gènes régulés par l'hypoxie.	p.63
Figure 31 : Détail des séquences formant un contig dans la base GigasDatabase.	p.75
Figure 32 : Informations disponibles pour une séquence contenue dans la base GigasDatabase	p.76
Figure 33 : Les différents modes de requête disponibles dans la base GigasDatabase.	p.77
Figure 34 : Les différentes possibilités d'exportation des résultats suite à une requête effectuée dans la base GigasDatabase.	p.78
Figure 35 : Fonctions associées à l'ensemble des séquences disponibles dans la base de données de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> : la GigasDatabase.	p.79
Figure 36 : Estimation de la taille des génomes de quelques bivalves.	p.81
Figure 37 : Les principaux types de puce à ADN.	p.122
Figure 38 : Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur puce à ADN.	p.123
Figure 39 : Taux de mortalité obtenus pour les huîtres Résistantes et Sensibles prélevées au cours de l'expérimentation « <i>in situ</i> ».	p.126
Figure 40 : Exemples de scatterplot de valeurs de microarrays obtenues pour deux réplicats techniques (A) et deux réplicats biologiques (B).	p.127
Figure 41 : Clustering hiérarchique des 34 ESTs différemment exprimés entre R et S pour les 4 dates analysées.	p.128
Figure 42 : Niveaux de mRNA estimés par PCR en temps réel des 9 gènes sélectionnés entre des gonades d'huîtres R et S prélevées pour les microarrays et pour 4 autres expérimentations, faisant varier l'âge, la génération et l'environnement.	p.131
Figure 43 : Représentation schématique des TGFβ.	p.167

Figure 44 : Structure schématique des protéines des membres de la famille des TGFβ.	p.168
Figure 45 : Voies de signalisation associées à l'activation des TGFβ.	p.169
Figure 46 : Les différents membres appartenant à la super-famille des TGFβ et les récepteurs associés exprimés dans les ovocytes et dans les cellules somatiques (cellules de la granulosa et cellules de la thèque).	p.171
Figure 47: Schéma représentant les variations d'expression des membres TGFβ-1 et TGFβ-3 dans les différentes cellules du testicule.	p.172
Figure 48 : Séquence nucléotidique et séquence protéique déduite du gène <i>oyster-TGFβ-like</i> de <i>C. gigas</i> .	p.174
Figure 49 : Niveaux de transcrits de <i>og-TGFβ-like</i> relatifs au transcrits du gène facteur d'élongation I dans tous les tissus d'huîtres.	p.175
Figure 50 : Niveaux de transcrits de <i>og-TGFβ-like</i> relatifs au transcrits du gène facteur d'élongation I durant un cycle complet de reproduction de <i>C. gigas</i> .	p.176
Figure 51 : Analyse histologique et localisation de l'expression de <i>og-TGFβ-like</i> par HIS dans des gonades femelles de <i>C. gigas</i> .	p.177
Figure 52 : Analyse histologique et localisation de l'expression de <i>og-TGFβ-like</i> par HIS dans des gonades mâles de <i>C. gigas</i> .	p.178
Figure 53 : Schéma récapitulatif des différentes expérimentations réalisées dans le cadre de la comparaison transcriptomique des lignées R et S.	p.197
Figure 54 : Localisation des 5 zones QTLs (en rouge) sur une partie de la cartographie génétique consensus.	p.200
Figure 55 : Principales hypothèses associées à l'apparition des mortalités, issues de l'identification de gènes candidats par l'analyse microarray.	p.202
Tableau 1 : Différences de critères de description entre une maladie dite « Mendélienne » et une maladie dite « Multifactorielle »	p.5
Tableau 2 : Sélection de quelques candidats d'intérêts issus de la base de données GigasDatabase, similaires à des gènes potentiellement impliqués dans les réseaux de régulation physiologique.	p.80
Tableau 3 : Liste des ESTs différentiellement exprimés entre les gonades des lignées Résistantes et Sensibles, identifiés par analyse microarray.	p.129
Tableau 4 : Les différentes conditions testées sur les 9 gènes sélectionnés par microarray	p.130
Tableau 5 : Liste des 36 ESTs différentiellement exprimées entre les gonades des lignées Résistantes et Sensibles, identifiées par ANOVA à la date 4, et potentiellement associé à l'immunité.	p. 133





## **RESUME**

Ce travail a contribué au développement d'outils de génomique spécifiques à l'huître *Crassostrea gigas* et visait à identifier des déterminants moléculaires de la survie estivale chez cette espèce. Dans cette optique, un effort de séquençage a été réalisé, permettant l'obtention d'un total de 29745 unigènes, assemblés dans une base de données. 9058 d'entre eux ont été utilisés pour produire la première puce à ADNc spécifique de *C. gigas*, servant de support à la comparaison transcriptomique des lignées d'huîtres Résistantes (R) et Sensibles (S) à la mortalité estivale. 34 gènes sont apparus différemment exprimés au cours de la période précédant les mortalités. Ces gènes sont notamment associés aux processus de reproduction et de stress oxydatif, soulignant le coût de la reproduction et l'importance de la défense anti-oxydante dans l'apparition d'une déficience immunitaire avant les mortalités. Parmi eux, le gène *oyster-TGFbeta-like*, exprimé spécifiquement dans les cellules somatiques de la gonade, pourrait être à l'origine des différences d'investissement reproducteur observées entre les lignées R et S. Cette hypothèse ouvre de nouvelles perspectives d'étude du coût de la reproduction dans les mortalités estivales. Ces gènes font l'objet d'analyses fonctionnelles et seront cartographiés afin de comprendre leur rôle chez l'huître et de déterminer leur implication dans les mortalités.

**Mots-clefs** : bivalves, mortalités estivales, base de données, puce à ADN, Transforming Growth Factor beta., reproduction.

## **ABSTRACT**

This work contributed to the development of specific genomic tools for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, aiming to identify molecular markers associated with summer survival of this species. To do so, 29745 ESTs obtained from different sequencing programs were grouped in a unique database. 9058 unigenes have been used to produce a cDNA microarray, to compare lines selected to be Resistant (R) or Sensitive (S) to summer mortality. 34 genes were observed as differentially expressed before the mortality event. Most of these genes are associated with reproduction and oxidative stress. This underlines the implication of the cost of reproduction and the importance of oxidative stress defenses in development of an immune weakness before the mortality event. The gene *oyster-gonadal-TGFbeta-like*, specifically expressed in the somatic cells of the gonad, could be involved in the differential reproductive investment observed between R and S lines. This hypothesis gives additional clue to study the implication of reproductive cost in the summer mortality phenomena. Genes will be studied by functional analyses and will also be mapped, in order to unravel their function and to identify their role in the mortality event.

**Keywords** : bivalves, summer mortality, database, microarray, Transforming Growth Factor beta, reproduction.