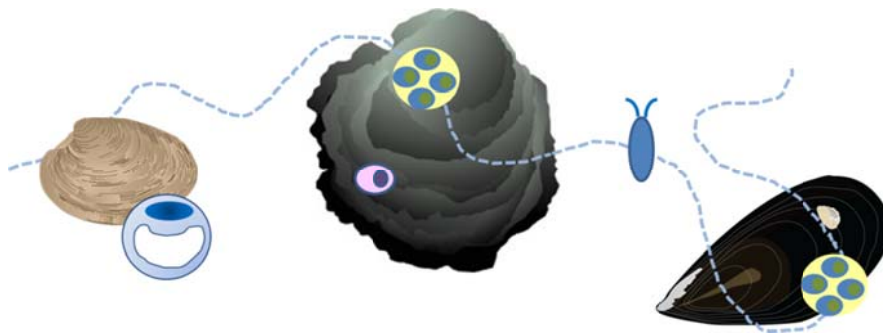


DIPLÔME D'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES
UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

Interactions bivalves-protozoaires parasites : un équilibre dynamique



Isabelle ARZUL
Cadre de recherche à l'Ifremer
Soutenance le 3 octobre 2014

JURY

Mr Gilles BŒUF Professeur UPMC, Paris VI président MNHN
Mr Paco BUSTAMANTE Professeur Université La Rochelle
Mr Xavier DE MONTAUDOUIN Maître de Conférences HDR Université de Bordeaux, rapporteur
Mr Philippe GOULLETQUER Directeur de Recherche IFREMER
Mme Christine PAILLARD Directeur de Recherche CNRS IUEM rapporteur
Mr Richard THIERY Directeur de Recherche ANSES Sophia Antipolis rapporteur

Un grand merci

aux rapporteurs et membres du jury que j'ai été heureuse de croiser en diverses circonstances et qui m'ont fait le plaisir d'accepter d'évaluer ce travail

Gilles : les papillons, l'Égypte, la biodiversité... tout sujet devient passionnant lorsque l'on t'écoute

Xavier : Il y a tant à faire sur les parasites en milieu marin ! Bientôt, un projet en commun ?

Christine : C'est une joie d'échanger à nouveau sur le thème des interactions hôte-parasite, merci pour ton enthousiasme

Philippe : Ton intérêt pour les projets que j'ai pu développer m'a toujours touchée

Richard : Après les virus, les protozoaires : merci d'avoir accepté de suivre mon évolution du monde des nano- aux micro-organismes !

Paco : un grand merci pour ton aide précieuse pour ce passage d'HDR

à tous les collègues du Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, équipes pathologie, génétique, éclosion et Florence, Henri, Martine et Véronique qui rendent notre cadre de travail si agréable

à André Gérard, Philippe Gouletquer, Tristan Renault et Sylvie Lapègue qui m'ont toujours soutenue dans mes travaux scientifiques

à Hervé qui m'a aiguillée le long de cet itinéraire scientifique

à Tristan qui a accompagné mes premiers pas dans le monde de la recherche

à Franck qui a accompagné mes premiers pas dans le monde de la référence

Et comme les travaux présentés dans le document sont les fruits d'un travail collectif, je remercie très chaleureusement l'ensemble des personnes qui y ont contribué, en particulier Bruno, Céline, Delphine, Jean-Pierre, Laurence et Maeva

Mais ces travaux sont également et surtout ceux de doctorants ou post-doctorants que j'ai eu la chance d'encadrer : Noelia, Inmaculada, Benjamin, Maria, Estelle, Séverine et aujourd'hui Ophélie... Que de belles expériences ! On ne voudrait jamais qu'elles s'arrêtent.

L'opportunité d'accueillir des stagiaires de divers horizons donne en permanence du renouveau au laboratoire, merci à tous ceux que j'ai eu le plaisir de rencontrer et d'encadrer avec une mention spéciale pour Purotu avec qui j'ai cohabité pendant cette rédaction !

L'une des richesses de notre métier est de pouvoir rencontrer et collaborer avec de nombreux collègues d'ici ou de très loin qui, par leur passion et les projets qu'ils développent nous motivent dans nos travaux de recherche, merci à eux

Ils ont été d'un grand soutien:

Jean, merci pour les bonbons et les croissants !

Bruno, merci pour ta relecture même si c'était parfois soporifique !

Benjamin, je t'ai connu tout petit, tu as bien grandi !

Le milieu de la recherche c'est bien, mais c'est encore mieux

Grâce aux amis qui rendent la vie si belle

Grâce à la famille : mes parents, mes drôles de sœurs

Et surtout Xavier, Luz et Esteban

Sommaire

-Liste des abréviations et acronymes-	3
-Liste des figures-	5
Introduction.....	7
I. Les modèles d'étude	12
A. Les parasites.....	12
1. Parasites du genre <i>Perkinsus</i>	13
2. Parasites du genre <i>Marteilia</i>	16
3. Parasites du genre <i>Bonamia</i>	19
4. Récapitulatif.....	21
B. Les bivalves	22
II. Diversité des parasites protozoaires chez les bivalves	25
A. Plus de gènes, c'est bien	26
1. Utilisation d'amorces dégénérées.....	28
2. Caractérisation de gène à partir d'ADNc.....	29
3. RNA seq.....	32
B. Développement d'outils diagnostiques	34
1. PCR en temps réel pour la détection et la quantification de <i>Bonamia ostreae</i>	34
2. PCR en temps réel pour la détection et le typage de <i>Marteilia refringens</i>	36
C. Un parasite peut en cacher un autre	37
1. Caractérisation moléculaire des parasites du genre <i>Bonamia</i> en Europe	37
2. Caractérisation moléculaire des parasites du genre <i>Perkinsus</i>	42
3. Variabilité sur un même thème	44
D. Conclusion.....	48
III. Spécificité des parasites protozoaires chez les bivalves	50
A. Nouvelles espèces hôtes, nouvelles régions géographiques.....	52
B. Une approche bibliographique	54
C. Des approches expérimentales.....	57
1. Essai d'infection par cohabitation	58
2. Essai d'infection <i>in vitro</i>	58
D. Conclusion.....	62
IV. Transmission des parasites protozoaires des bivalves	64
A. - Etude du cycle de <i>Bonamia ostreae</i>	65
1. - Distribution dans l'hôte <i>Ostrea edulis</i>	65
2. - Survie dans l'eau de mer	71
3. - Sensibilité des larves à <i>Bonamia ostreae</i>	73
B. - Etude du cycle de <i>Marteilia refringens</i>	75
1. Comparaison inter-site de la dynamique d'infection à <i>Marteilia refringens</i> chez la moule.....	75

2.	Interactions entre <i>Marteilia refringens</i> et zooplancton.....	80
3.	Interactions entre <i>Marteilia refringens</i> et <i>Paracartia grani</i>	82
4.	Interactions entre moules et copépodes <i>Paracartia grani</i>	87
C.	Conclusion.....	90
V.	Hôte-parasite : la course aux armements	92
A.	Des protocoles expérimentaux et des outils analytiques adaptés.....	94
1.	Protocoles expérimentaux.....	94
2.	Des outils moléculaires.....	96
3.	Des outils cellulaires	100
B.	Interactions à l'échelle de la cellule.....	102
1.	Etude cinétique de la réponse à <i>Bonamia ostreae</i>	102
2.	La galectine : une porte d'entrée pour le parasite ?	105
C.	Etre résistant à la bonamiose, ça veut dire quoi ?.....	110
1.	Huîtres plates/Huîtres creuses	111
2.	Huîtres plates sensibles/Huîtres plates sélectionnées.....	112
3.	Composante génétique de la résistance à la bonamiose.....	119
D.	L'apoptose : un mécanisme de défense de l'huître parfois déjoué par le parasite .	124
E.	Conclusion.....	129
	Perspectives	131
	Références bibliographiques.....	134
	CURRICULUM VITAE	148

-Liste des abréviations et acronymes-

AA Acide Aminé
ADN Acide DésoxyriboNucléique
ADNc Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AFLP Amplification Fragment Length Polymorphism
AquaGenet Réseau transnational pour la biotechnologie en aquaculture
ARN Acide RiboNucléique
ARNm Acide RiboNucléique messenger
ARNr Acide RiboNucléique ribosomique
Bivalife Management of infectious diseases in oysters and mussels in Europe
CT Cycle Threshold
DIPNET Disease Interactions and Pathogen exchange between farmed and wild aquatic animal populations – a European NETwork
DMSO DiMéthylSulfOxyde
ec-SOD extracellular SuperOxide Dismutase
eDNA environmental DNA
EF1 α Elongation Facteur 1 α
EFSA European Food Safety Authority
EAR Espèces Azotées Réactives
EOR Espèces Oxygénées Réactives
eQTL expression Quantitative Trait Loci
EST Expressed Sequenced Tags
FAO Food and Agriculture Organization
GAPDH Glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase
HSS Hybridation Suppressive Soustractive
HSP Heat Shock Protein
IAP Inhibitor of apoptosis
IFREMER Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IGS Inter Genic Spacer
INRA Institut National de la Recherche Agronomique
IRF Interferon Regulatory Factor
ITS Internal Transcribed Spacer
LGPM Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins
LOD Logarithm of the Odds ratio
LRUE Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
NADPH Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme réduite)
NGS New Generation Sequencing
NO Nitric Oxide
 ω -GST omega Glutathione-S-Transferase
OIE Office Internationale des Epizooties= Organisation Mondiale pour la Santé Animale
OsHV-1 Oyster HerpesVirus type 1
PANDA Permanent Advisory Network for Aquatic Diseases
PERLE Programme d'Expérimentation et de Recherche sur L'huître plate *Ostrea edulis*
PCR Polymerase Chain Reaction
QTL Quantitative Trait Locus
QX disease Queensland unknown disease
RACE PCR Rapid Amplification of cDNA Ends PCR
REMCO REssources Marines COurses
REPAMO Réseau de PATHologie des Mollusques
RNA seq RNA sequencing

RFTM Ray's Fluid Thioglycolate Medium
SNP Single Nucleotide Polymorphism
SOD SuperOxide Dismutase
TIMP Tissue Inhibitor Metallo-Proteinase
TNF Tumeur Necrosing Factor
TRP Tetra-Trico peptide Repeat
TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UV Ultra-Violet
WOPER Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry

-Liste des figures-

Figure 1. Production mondiale des principaux groupes de bivalves entre 2003 et 2012.	8
Figure 2. Une représentation de la phylogénie des eucaryotes	12
Figure 3. Cycle de <i>Perkinsus olseni</i> parasitant la palourde <i>Venerupis philippinarum</i>	15
Figure 4. Proposition de classification de l'ordre des Paramyxida	16
Figure 5. Cycle de développement de <i>Marteilia refringens</i> dans l'huître plate	18
Figure 6. <i>Bonamia exitiosa</i> chez <i>Ostrea chilensis</i> et <i>Bonamia ostreae</i> chez <i>Ostrea edulis</i>	21
Figure 7. Phylogénie et systématique des bivalves.....	24
Figure 8. Séquences disponibles pour les parasites du genre <i>Bonamia</i>	27
Figure 9. Séquences disponibles pour les parasites du genre <i>Marteilia</i>	27
Figure 10. Analyse phylogénétique des séquences d'actine des Haplosporidies.....	28
Figure 11. Analyse phylogénétique des séquences partielles de HSP90 d'eucaryotes	30
Figure 12. Effet du radicicol sur l'internalisation de <i>B. ostreae</i> dans les hémocytes.	31
Figure 13. Meilleures identités des contigs de <i>Bonamia ostreae</i>	33
Figure 14. PCR en temps réel pour la détection et quantification de <i>Bonamia ostreae</i>	35
Figure 15. Distribution des parasites <i>Bonamia ostreae</i> et <i>B. exitiosa</i> en Europe.....	39
Figure 16. Analyse phylogénétique de la région 18S-ITS1-5.8S-ITS2 de <i>B. exitiosa</i>	41
Figure 17- Trophozoïtes, schizontes et zoosporanges de <i>Perkinsus chesapeakei</i>	44
Figure 18. Alignement de la région ITS1 de <i>Marteilia refringens</i>	46
Figure 19. Analyse phylogénétique de la région ITS1 de <i>Marteilia refringens</i> en Corse.....	48
Figure 20. Filtres de rencontre et de compatibilité	51
Figure 21. Mise en contact <i>Bonamia ostreae</i> et hémocytes de trois espèces d'huître.....	60
Figure 22. Observation en microscopie électronique à transmission d'hémocytes de trois espèces d'huître mis en contact avec <i>Bonamia ostreae</i>	62
Figure 23. Niveaux d'infection à <i>Bonamia ostreae</i> détectés au cours d'une expérience d'infection par cohabitation.....	67
Figure 24. Détection de <i>Bonamia ostreae</i> par organe en fonction des niveaux d'infection... 68	68
Figure 25. Détection de <i>Bonamia ostreae</i> en hybridation <i>in situ</i> (faibles niveaux d'infection).....	68
Figure 26. Détection et quantification de <i>Bonamia ostreae</i> par organe	70
Figure 27. Proposition de cycle pour <i>Bonamia ostreae</i> dans son hôte <i>Ostrea edulis</i>	71
Figure 28. Activités de type estérase de <i>Bonamia ostreae</i> en fonction de la salinité.....	72
Figure 29- Larve d'huître plate infectée par <i>Bonamia ostreae</i> (hybridation <i>in situ</i>).	74
Figure 30. Dispersion du parasite <i>Bonamia ostreae</i> à partir de son hôte <i>Ostrea edulis</i>	75
Figure 31. Dynamique de <i>Marteilia refringens</i> dans les moules <i>Mytilus galloprovincialis</i>	79
Figure 32. Copépode <i>Paracartia latisetosa</i> infecté par <i>Marteilia refringens</i>	82
Figure 33. Distribution de <i>Paracartia grani</i> et <i>Marteilia refringens</i>	84
Figure 34. Abondance de <i>Paracartia grani</i> et détection de <i>Marteilia refringens</i>	85
Figure 35. <i>Paracartia grani</i> (CIII) infecté par <i>Marteilia refringens</i>	86
Figure 36. Efficacité de rétention des différents stades de copépode par la moule.....	89
Figure 37. Dynamique de <i>Marteilia refringens</i> dans l'étang de Thau (synthèse).....	90
Figure 38. Structure d'Oe Gal.....	100
Figure 39. Suivi dans le temps de l'infection d'hémocytes par <i>Bonamia ostreae</i>	102
Figure 40. Interactions moléculaires et cellulaires entre hémocytes d'huître plate et <i>Bonamia ostreae</i> (synthèse).....	105

Figure 41. Implication de la galectine dans l'internalisation de <i>Bonamia ostreae</i>	107
Figure 42. Expression relative de Oe-Gal dans les tissus infectés par <i>Bonamia ostreae</i>	108
Figure 43. Mortalité et détection de <i>Bonamia ostreae</i> dans des huîtres plates « résistantes » et « sensibles » (infection par cohabitation).....	114
Figure 44. Niveau d'infection à <i>Bonamia ostreae</i> dans des huîtres plates « résistantes » et « sensibles » (infection par cohabitation).....	115
Figure 45. Expression relative d'Oe Fas ligand, Oe IAP, SOD et Oe Ec-SOD dans des huîtres plates « résistantes » et « sensibles » (infection par injection).....	117
Figure 46. Expression relative d'Oe Fas ligand, Oe IAP, SOD et Oe Ec-SOD dans des huîtres plates « résistantes » et « sensibles » (infection par cohabitation).	118
Figure 47. Catégories fonctionnelles des EST utilisées pour caractériser des SNPs.....	120
Figure 48. Exemple de distribution des « LOD score » le long du groupe de liaison 8.....	122
Figure 49. Principales voies de l'apoptose chez les mollusques.....	125
Figure 50. Modifications cellulaires survenant au cours de l'apoptose	127
Figure 51. Réponse apoptotique des hémocytes à <i>Bonamia ostreae</i>	128

Introduction

Les bivalves constituent la deuxième classe la plus importante des mollusques, qui eux-mêmes constituent le deuxième plus large phylum animal et le plus important dans le milieu marin. Abondants dans les écosystèmes aquatiques côtiers, les bivalves ont un rôle majeur dans leur structure et fonctionnement (Dame, 1993, Newell, 2004). Ces espèces ont en effet un contrôle descendant important sur le phytoplancton, ils réduisent ainsi les risques d'eutrophisation et contribuent à augmenter la productivité des macro-algues et du microphytobentos (Newell, 2004, Porter et al., 2004). De plus, le transfert de matière inorganique dans les faeces et pseudo faeces, de la colonne d'eau à la surface des sédiments favorise le couplage benthos-pelagos (Dame, 1993).

Les conséquences de la disparition d'espèces bivalves sur le fonctionnement et la structure des écosystèmes ont été à plusieurs occasions étudiées. Par exemple, en baie de Chesapeake (U.S.A), la disparition de gisements d'huîtres américaines *Crassostrea virginica* s'est accompagnée d'une augmentation de l'occurrence de blooms phytoplanctoniques pouvant induire une hypoxie (Kemp et al., 2005). Dans la baie Great South (U.S.A.) la diminution de l'abondance du clam *Mercenaria mercenaria* a altéré la dynamique du phytoplancton et du zooplancton se traduisant notamment par l'apparition de « marées marron » dues à l'espèce *Aureococcus anophagefferens* (Lonsdale et al., 2007). Le déclin des bivalves peut également avoir un impact aux échelons trophiques supérieurs. Par exemple, la réduction de l'abondance et de la qualité des coques *Cerastoderma edule* dans la Wadden Sea aux Pays Bas attribuée au dragage des coquillages s'est traduit par la disparition dans cette zone du bécasseau maubèche (*Calidris canutus islandica*) (van Gils et al., 2006).

Outre leur importance pour les écosystèmes marins, les bivalves, de par leur abondance le long de nos côtes et leur intérêt comme source de nourriture, ont très tôt attiré l'homme. Aujourd'hui, la conchyliculture représentent près de 20% de la production aquacole mondiale (FAO, 2012). Cette contribution devrait augmenter au cours des prochaines décennies. En effet, les productions aquacoles ne reposant pas sur la consommation de « poissons fourrage » sont aujourd'hui privilégiées du fait de la raréfaction de certaines

ressources halieutiques. Parmi les bivalves, le groupe constitué par les fousseurs (palourdes, et coques) arrive en tête en termes de quantité produite et de valeur marchande. En 2012, leur production approchait les 5 millions de tonnes pour une valeur de 5 millions de dollars américains (Figure 1).

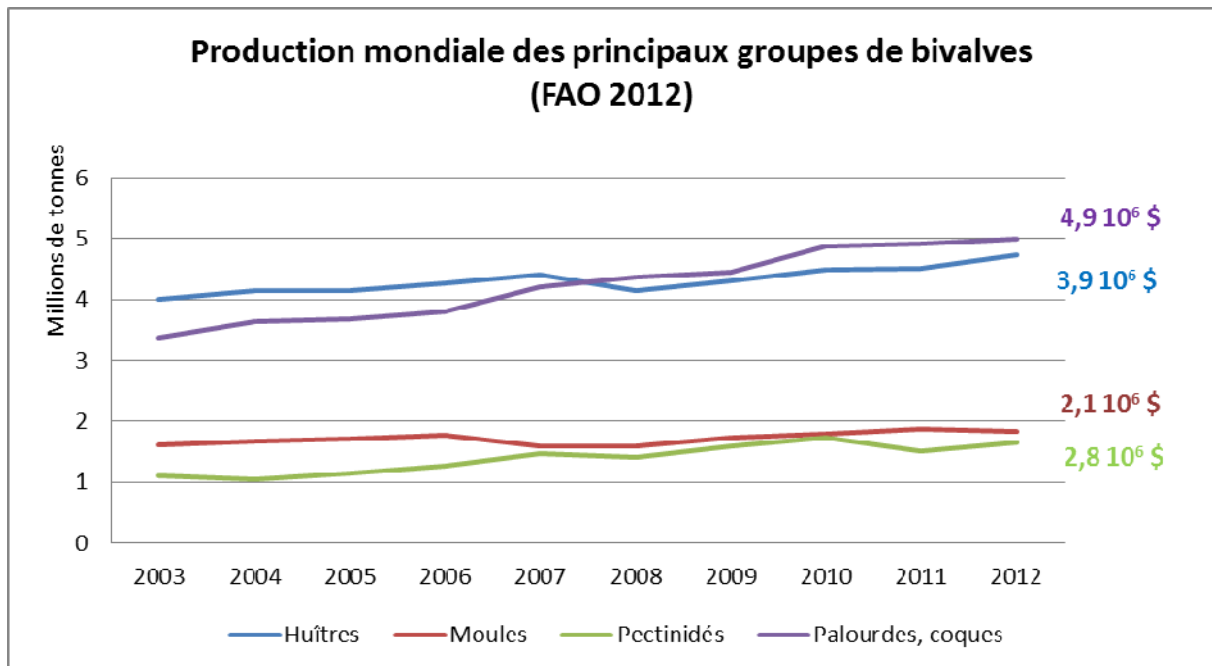


Figure 1. Production mondiale des principaux groupes de bivalves entre 2003 et 2012 (en millions de tonnes). La valeur marchande de ces productions est indiquée pour chaque groupe pour l'année 2012 (FAO, 2012).

En exploitant cette ressource, l'homme a joué et continue de jouer un rôle important en façonnant les populations de bivalves benthiques et leurs écosystèmes. Cette exploitation a commencé par la simple collecte des bivalves disponibles localement et repose aujourd'hui beaucoup plus largement sur des systèmes d'élevage d'espèces souvent non indigènes.

Les transferts de coquillages à des fins d'aquaculture et pour la consommation humaine se sont intensifiés augmentant alors les risques d'introduction d'espèces associées et d'organismes pathogènes. Les pratiques de pêches ou d'élevage des coquillages ont donc un impact majeur sur la diversité des espèces présentes au sein des écosystèmes que ce soit des espèces d'intérêt commercial ou des espèces non exploitées mais également sur la diversité des parasites associés.

Les maladies sont reconnues comme un frein majeur à la production de mollusques bivalves et les parasites représentent un facteur majeur de régulation des populations de

nombreuses espèces en conditions naturelles (ex : Hudson et al., 1998). En raison de leur mode de production, le plus souvent en milieu ouvert, et de l'absence de production d'anticorps, le contrôle des maladies chez les bivalves ne peut reposer sur l'utilisation de traitement ou de vaccin au sens conventionnel du terme. La mise en place de programmes de surveillance et les restrictions des transferts sont les seules mesures actuellement disponibles pour éviter l'introduction de maladie dans des zones indemnes. Mais une fois le parasite introduit, il s'agit de minimiser son impact sur les populations de bivalves en proposant des mesures adaptées de gestion des stocks et/ou en développant des programmes de sélection d'animaux résistants aux maladies. Ces solutions ne peuvent être proposées sans une bonne connaissance de la biologie des parasites et de leurs interactions avec leurs hôtes.

Le parasitisme est une forme d'association entre deux organismes, l'un (le parasite) dépendant et tirant profit de l'autre (l'hôte). Le bénéfice est le plus souvent la nourriture. Les parasites représentent la majorité des espèces vivantes et aucune espèce libre ne semble échapper au parasitisme (Poulin and Morand, 2000). De nombreux travaux ont mis en évidence leur importance en tant que force sélective au travers de leurs multiples impacts sur les hôtes, que ce soit sur leur physiologie, leur comportement ou leur démographie. Les parasites jouent donc un rôle significatif dans la dynamique et la composition des écosystèmes (Wood et al., 2007 ; Kuris et al., 2008). L'ubiquité des parasites s'explique notamment par leur importance quantitative (biomasse) et leur extrême diversité au sein des écosystèmes. Cette diversité est loin d'être appréhendée dans sa totalité. La compréhension du fonctionnement des populations et des écosystèmes ne peut être complète sans l'intégration des parasites.

C'est dans ce paysage que nous nous intéressons aux interactions entre les bivalves et les parasites dans un environnement et un contexte socio-économique qui évoluent. En effet, le réchauffement climatique, l'intensification des échanges commerciaux et du trafic maritime apparaissent comme des causes majeures de l'expansion des maladies chez les mollusques (Elston, 1984; Grizel et al., 1988; Ford and Chintala, 2006; Pecher et al., 2008).

Parmi les parasites connus pour leur impact négatif sur les populations de bivalves, les travaux présentés dans le document concerneront plus particulièrement certains protozoaires. Les protozoaires sont des eucaryotes unicellulaires le plus souvent hétérotrophes mais qui peuvent utiliser d'autres stratégies pour produire leur énergie. Ces protistes généralement libres et très abondants dans les milieux aquatiques contribuent à augmenter la minéralisation rendant disponibles les nutriments pour d'autres organismes. De nombreux protozoaires sont également des parasites tout au long ou pour partie de leur cycle, exploitant alors l'énergie de leurs hôtes. C'est le cas des protozoaires parasites des genres *Perkinsus*, *Marteilia* et *Bonamia* qui affectent sévèrement les mollusques marins qu'ils soient cultivés ou sauvages à travers le monde. Pour cette raison, ils font l'objet de programmes de surveillance et de restrictions de transferts entre régions infectées et régions indemnes (OIE, 2014).

Cependant, d'après Fernández Robledo et al. (2014), le nombre de publications concernant ces parasites ne reflète pas forcément leur impact économique et environnemental. Cette analyse de la littérature met en évidence que les travaux de recherche sont principalement motivés par l'apparition de mortalités massives de bivalves. Une fois les agents étiologiques décrits et caractérisés, des études sont initiées afin de comprendre l'émergence des maladies et les interactions hôtes-parasites-environnement. La réalisation et le succès de ces travaux dépendent le plus souvent de la disponibilité de protocoles d'isolement, de culture et de transmission des parasites.

A ce jour, seuls les parasites du genre *Perkinsus* peuvent être cultivés *in vitro* (La Peyre et al., 1993), ce qui facilite les études portant sur sa biologie. De plus, la disponibilité du transcriptome et du génome de *Perkinsus marinus* (Fernández-Robledo and Vasta, 2010) et le développement récent d'une méthode de transfection (Fernandez-Robledo et al., 2008) en font aujourd'hui un organisme modèle pour étudier les maladies dues à des protozoaires. Cependant, les parasites protozoaires sont très variés, présentent des spécificités qui leur sont propres. Appréhender cette diversité permet d'entrevoir les multiples interactions qui existent à différentes échelles : celle de la cellule, de l'individu, de la population et enfin à l'échelle de l'écosystème.

Sans répondre à toutes les questions qui se posent, les travaux présentés dans le document nous permettent de comprendre pourquoi ces interactions, apparemment stables, sont sans cesse réajustées et pourquoi l'équilibre d'un système hôte parasite est dynamique.

Après avoir dressé un portrait synthétique des principaux protagonistes des travaux présentés ci-après nous nous intéresserons

- 1- à la diversité inter et intra spécifique des parasites protozoaires chez les bivalves marins
- 2- à leur spécificité pour leurs hôtes
- 3- à leur stratégie de transmission
- 4- à la course aux armements dans le modèle huître plate -*Bonamia ostreae*

Ces travaux ont été développés

dans le cadre des activités du Laboratoire de Référence pour l'Union Européenne (LRUE) pour les maladies des mollusques, du Laboratoire de Référence pour l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) pour la bonamiose et la marteiliose, de différents projets européens (PANDA, DIPNET, WOPER, Bivalife, Aquagenet), de projets régionaux (REMCO, PERLE), de collaborations internationales (Australie, Chili, Corée, Espagne, Etats-Unis, Tunisie, ...)

mais aussi à travers des projets de thèse (Noelia Carrasco, Benjamin Morga, Séverine Boyer, Estelle Harrang, Ophélie Gervais), des projets de post doctorat (Immaculada Lopez-Flores, Maria Prado-Alvarez) et l'encadrement de nombreux stagiaires

et bien sûr avec l'aide de nombreux collègues du LGPMM

Enfin, les résultats de ces études ouvrent de nouvelles portes, posent de nouvelles questions qui nous permettent de proposer en dernière partie du document de nouvelles perspectives sur le thème des interactions hôte-parasite.

I. Les modèles d'étude

A. Les parasites

La taxonomie des protozoaires est remaniée régulièrement. Si l'on se réfère à la classification révisée des eucaryotes d'Adl et al. (2012) (Figure 2), les parasites protozoaires concernés par les travaux exposés ci-après appartiennent au super groupe « SAR », nom proposé pour la première fois par Burki et al. (2008) dérivé de l'acronyme des trois groupes le composant : Stramenophiles, Alevolata et Rhizaria.

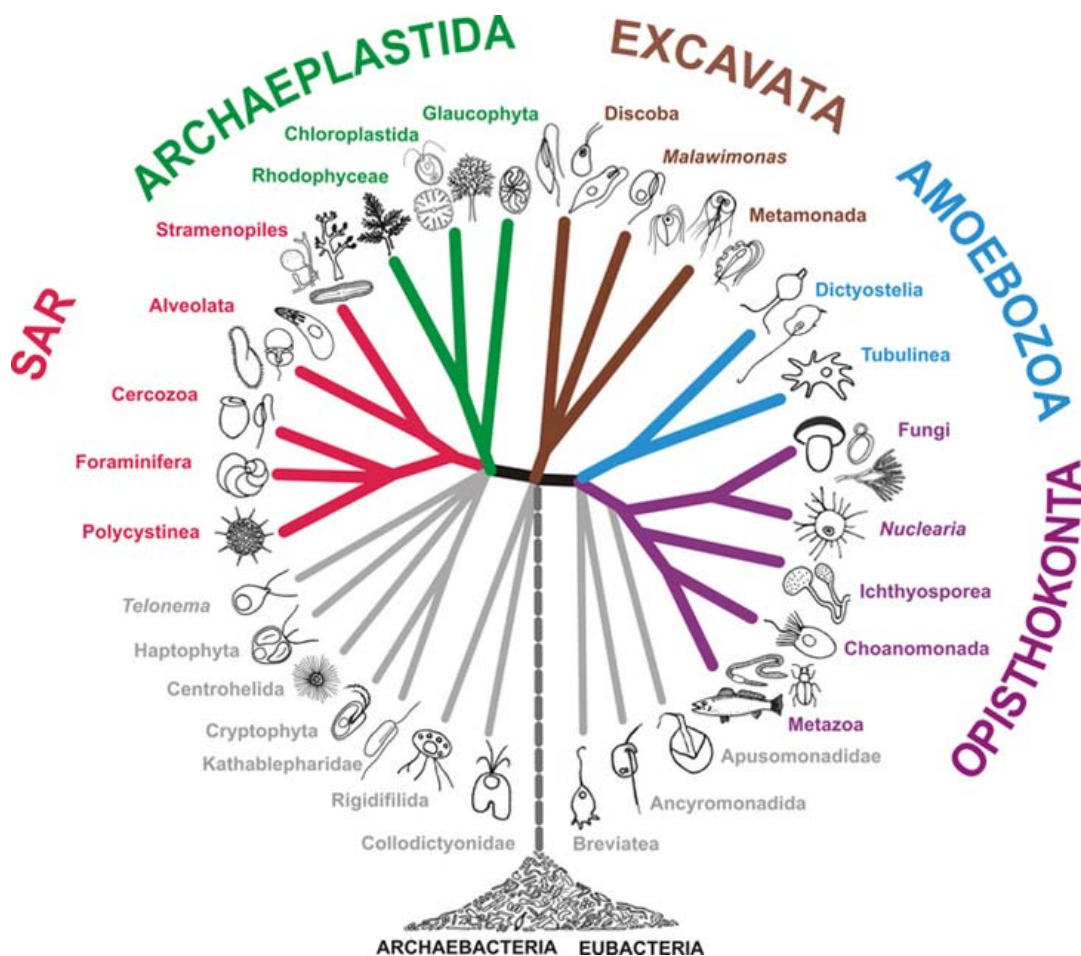


Figure 2. Une représentation de la phylogénie des eucaryotes (Adl et al., 2012)

La classification des genres *Bonamia*, *Marteilia* et *Perkinsus* extraite de la classification révisée des eucaryotes proposée par Adl et al. (2012) se présente ainsi :

- Rhizaria
 - Cercozoa
 - Ascetosporea
 - Haplosporida
Bonamia, Haplosporidium, Microcytos, Minchinia,
Urosporidium.
 - Paramyxida
Marteilia, Paramyxa, Paramarteilia.
- Alveolata
 - Protalveolata
 - Perkinsidae
Parvilucifera, Perkinsus.

Le genre *Perkinsus* appartient aux Alveolata tandis que les genres *Marteilia* et *Bonamia* appartiennent aux Rhizaria (Cavalier-Smith, 2002).

Les Rhizaria sont composés de plusieurs phyla en général non cultivables en laboratoire. De ce fait, très peu de séquences autres que les gènes des ARN ribosomiaux et parfois l'actine sont disponibles dans les bases de données. Néanmoins, les nouvelles techniques de séquençage offrent de nouvelles perspectives d'obtention de séquences permettant de mieux comprendre les relations phylogénétiques entre les phyla au sein de ce groupe.

1. Parasites du genre *Perkinsus*

Sept espèces sont aujourd'hui reconnues au sein du genre *Perkinsus* : *P. marinus*, *P. olseni*, *P. qugwadi*, *P. cheasapeaki*, *P. mediterraneus*, *P. honshuensis*, et *P. beihaiensis* (Villalba et al., 2004 ; Tableau 1). La plupart de ces espèces infectent les bivalves marins à l'exception de *P. olseni* qui infecte également des gastéropodes, plus précisément les ormeaux *Haliotis laevigata* et *H. rubra* (Lester and Davis, 1981).

<i>Espèce</i>	<i>Hôte type</i>	<i>Autres hôtes</i>	<i>Distribution géographique</i>	<i>Référence (1ère description)</i>
<i>P. marinus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>C. gigas, C. ariakensis, C. rhizophorae, C. gasar, C. corteziensis</i>	U.S.A (côte atlantique et Hawaï) Mexique (côtes Pacifique et Atlantique) Brésil	(Mackin et al., 1950)
<i>P. olseni</i>	<i>Haliotis laevigata</i>	Nombreuses espèces de palourdes, ormeaux mais aussi d'huîtres	Europe (Portugal, Espagne, France, Italie) Asie (Corée, Chine, Japon) Australie, Nouvelle Zélande Uruguay, Brésil	(Lester and Davis, 1981)
<i>P. atlanticus (= P. olseni)</i>	<i>Ruditapes philippinarum, R. decussatus</i>			(Azevedo, 1989)
<i>P. qugwadi</i>	<i>Patinopecten yessoensis</i>		Canada (côte pacifique)	(Blackbourn et al., 1998)
<i>P. andrewsi (= P. chesapeaki)</i>	<i>Macoma baltica</i>		U.S.A. (côte atlantique)	(Coss et al., 2001)
<i>P. chesapeaki</i>	<i>Mya arenaria</i>	<i>Macoma baltica, M. mitchelli, Mercenaria mercenaria, Tagelus plebeius, Crassostrea virginica</i>	U.S.A. (côte atlantique)	(McLaughlin et al., 2000)
<i>P. mediterraneus</i>	<i>Ostrea edulis</i>		Iles Baléares	(Casas et al., 2004)
<i>P. honshuensis</i>	<i>Venerupis philippinarum (=R. philippinarum)</i>		Japon	(Dungan and Reece, 2006)
<i>P. beihaiensis</i>	<i>C. hongkongensis, C. ariakensis</i>	<i>C. madrasensis</i>	Chine (sud) Inde	(Moss et al., 2008)

Tableau 1. Espèces parasites du genre *Perkinsus* caractérisées à ce jour, espèces hôtes, distribution géographique et première référence.

Perkinsus marinus et *P. olseni* semblent être les espèces présentant le plus d'impact sur leurs hôtes. Ces parasites protozoaires ont en effet été associés à des mortalités massives de coquillages, plus particulièrement d'huîtres creuses américaines *Crassostrea virginica* pour *P.*

marinus et de palourdes *Venerupis philippinarum* (= *Ruditapes philippinarum*) ou d'ormeaux *Haliotis laevigata* pour *P. olseni*.

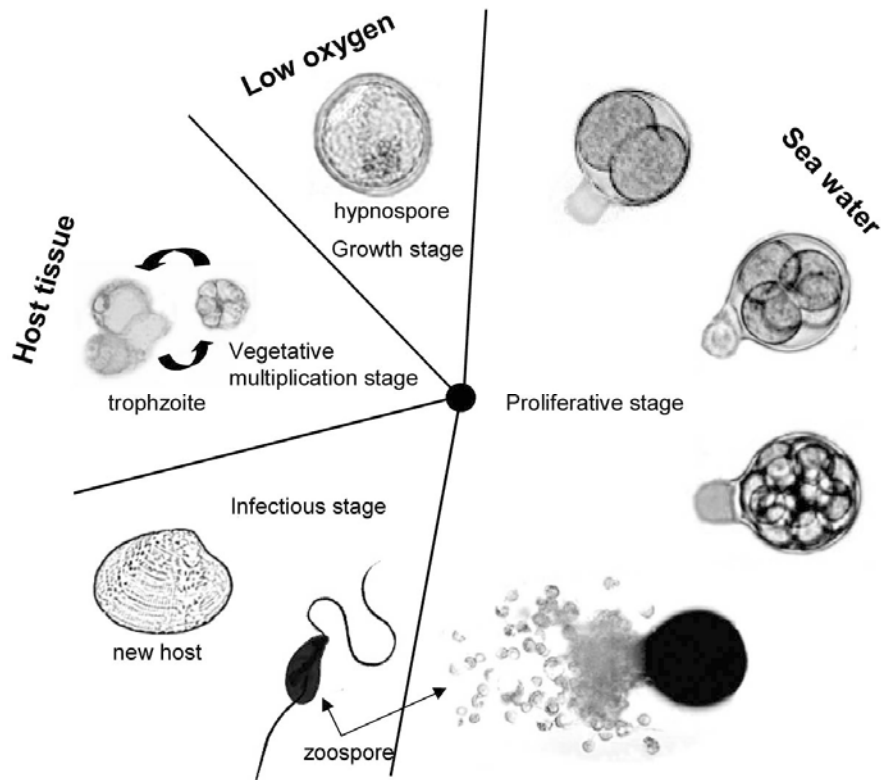


Figure 3. Cycle de *Perkinsus olseni* parasitant la palourde *Venerupis philippinarum* (Choi and Park, 2005).

La transmission de ces parasites est directe et ne nécessite pas d'hôte intermédiaire. Trois stades principaux ont été décrits dans le cycle des parasites du genre *Perkinsus* (Figure 3) :

- Les stades **trophozoïtes**, stades de multiplication végétative qui se multiplient par divisions binaires successives dans les tissus de l'hôte. Dans le cas de *Perkinsus olseni*, les trophozoïtes sont observés dans la plupart des tissus conjonctifs.
- En conditions *in vitro*, lorsque les cellules sont incubées dans du milieu RFTM, mais également dans les tissus des hôtes moribonds, les trophozoïtes s'élargissent et deviennent des **hypnospores**. Ces stades peuvent survivre pendant une longue période dans des conditions environnementales défavorables et gardent la capacité de zoosporuler. Les hypnospores sont considérées comme une forme « dormante » dans le cycle de *Perkinsus* (Casas et al., 2002).

-Enfin, lorsque les hypnospores se trouvent dans l'eau de mer, elles deviennent des zoosporanges, qui, par divisions binaires successives produisent des zoospores qui s'échappent du zoosporange par le « tube de décharge ». Les **zoospores** sont flagellées et considérées comme étant les formes infectantes bien que cette hypothèse n'ait pu être formellement vérifiée jusqu'à présent.

Des essais de culture *in vitro* de parasites du genre *Perkinsus* ont été développés avec succès (La Peyre, 1996) à partir de différents tissus infectés ou à partir d'hypnospores et permettent de reproduire l'infection en conditions expérimentales.

2. Parasites du genre *Marteilia*

D'après la classification d'Adl et al. (2012), le genre *Marteilia* appartient au super groupe des Rhizaria, premier rang Cercozoa, deuxième rang Ascetospora, troisième rang Paramyxida. Au sein de l'ordre des Paramyxida, Feist et al. (2009) proposent de s'appuyer sur la nature des spores, bi-tri ou tétracellulaires pour définir trois genres (Figure 4) : *Paramarteilia*, *Marteilia* et *Paramyxa*.

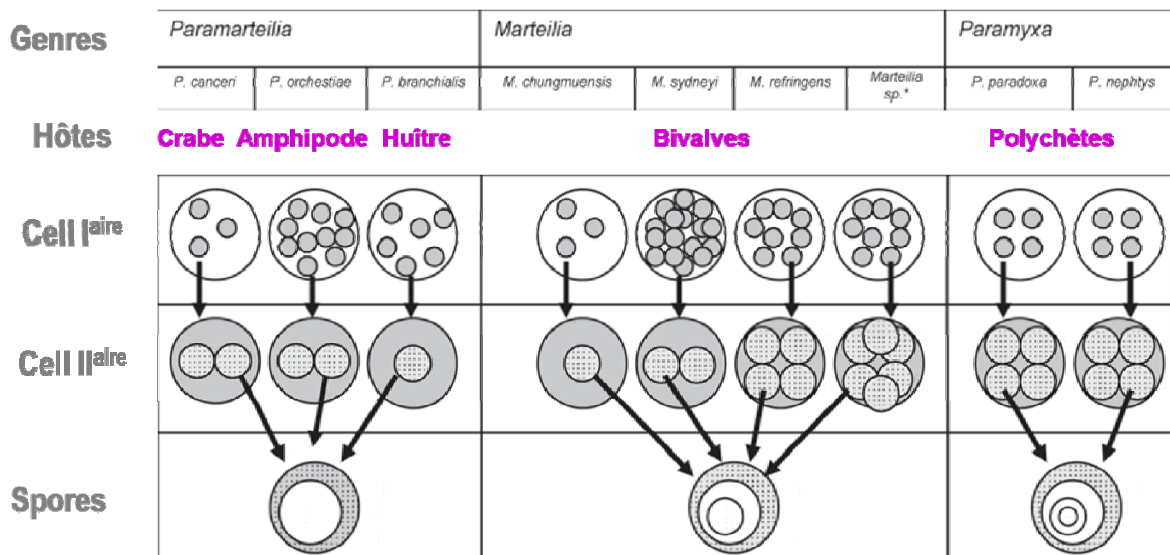


Figure 4. Proposition de classification de l'ordre des Paramyxida (Feist et al., 2009)

Le genre *Marteilia* comprend aujourd'hui quatre espèces parasites de bivalves marins :

- *Marteilia sydneyi* décrit en Australie (côte sud-est) est responsable de la maladie QX chez l'huître « Sydney Rock oyster » *Saccostrea commercialis* (Perkins and Wolf, 1976)
- *Marteilia refringens* initialement décrit chez l'huître plate *Ostrea edulis* comme l'agent de la maladie des abers (Grizel et al., 1974) est détecté en association à des mortalités en Europe. *Marteilia maurini* décrit chez les moules *Mytilus galloprovincialis* (Comps et al., 1982) et *M. edulis* (Auffret and Poder, 1983) est actuellement considéré comme synonyme de *M. refringens* (Lopez-Flores et al., 2004)
- *Marteilioïdes chungmuensis* (Comps et al., 1986) envahit et déforme la gonade de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans plusieurs pays asiatiques
- *Marteilia cochillia* a été récemment caractérisé lors d'épisodes de mortalités de coques *Cerastoderma edule* en Espagne (Carrasco et al., 2013 ; Villalba et al., 2014)

D'autres espèces ont été décrites telles que *Marteilia christenseni* chez la scrobiculaire *Scrobicularia piperata* en Charente Maritime (Comps, 1985) ou *M. lengehi* chez les huîtres *Saccostrea cucullata* du Golfe Persique (Comps, 1976). Cependant, aucune donnée moléculaire n'est actuellement disponible pour valider ces espèces.

Différents stades de développement de *Marteilia refringens* ont été décrits chez l'huître plate *Ostrea edulis* (Figure 5). Les premiers stades (=cellules primaires à secondaires) sont observés dans l'épithélium cilié de l'estomac ainsi que dans le reste de la glande digestive et plus rarement dans les branchies (Comps, 1970). La prolifération de ces stades dans les diverticules digestifs précède le développement des stades suivants qui conduiront à la formation des sporanges contenant des granules réfringents et des spores (Grizel et al., 1974).

Les cellules secondaires résultent d'une différenciation du cytoplasme autour des noyaux issus de la division endogène du noyau de la cellule primaire. La cellule primaire (environ 30 µm de diamètre) peut contenir jusqu'à huit cellules secondaires. Au sein des cellules

secondaires se forment quatre cellules tertiaires par bourgeonnement endogène (Desportes and Ginsburger-Vogel, 1977). Ces cellules tertiaires vont évoluer en spores (4 μm) contenant trois sporoplasmes issus de divisions endogènes, le sporoplasme le plus externe comporte également des haplosporosomes (Perkins, 1976). A maturité, la paroi des cellules primaires se rompt libérant les sporanges (9-19 μm) dans les faeces (Perkins, 1976).

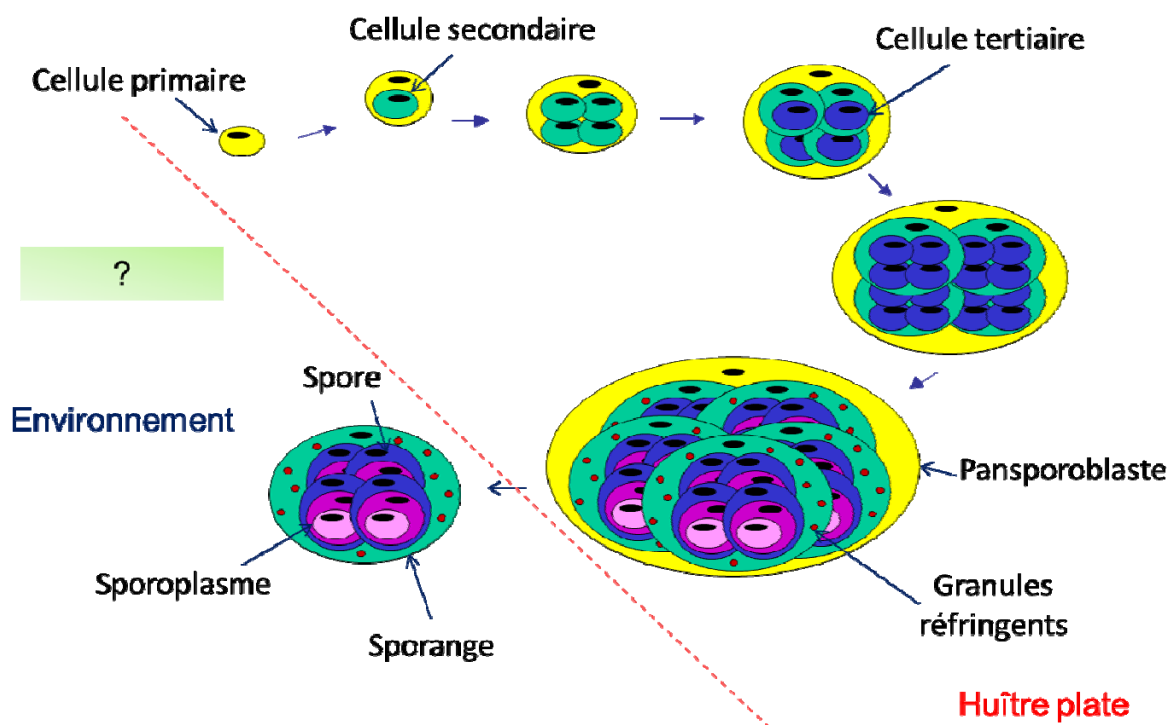


Figure 5. Cycle de développement de *Marteilia refringens* dans l'huître plate (Audemard, 2001)

La transmission du parasite entre bivalves n'est pas directe et semble impliquer un copépode *Paracartia grani* comme a pu le mettre en évidence Audemard (2001) dans les claires ostréicoles. Cependant, les essais de transmission réalisés en conditions expérimentales n'ont pas à ce jour permis de reproduire le cycle du parasite dans son ensemble : il a en effet été possible d'infecter des copépodes à partir de bivalves infectés mais pas l'inverse (Audemard, 2001 ; Carrasco et al., 2008b).

Bien qu'un protocole d'isolement des différents stades du parasite à partir de tissus infectés ait été développé (Robledo et al., 1995), il n'existe pas aujourd'hui de possibilité de reproduire la maladie en conditions expérimentales.

3. Parasites du genre *Bonamia*

Le genre *Bonamia* se situe au sein de la famille des Haplosporidia appartenant, comme les Paramyxida, au super groupe des Rhizaria, premier rang Cercozoa et deuxième rang Ascetospora. La famille des Haplosporidia compte quatre genres *Haplosporidium*, *Minchinia*, *Urosporidium* et *Bonamia* presque tous endoparasites d'invertébrés marins. Contrairement aux autres espèces de la famille, les parasites du genre *Bonamia* ne forment pas de spore. Leur petite taille (<5 µm) leur a valu le nom générique de « microcell », regroupant les espèces des genres *Bonamia* et *Mikrocytos*.

A ce jour, quatre espèces du genre *Bonamia* ont été caractérisées :

- *Bonamia ostreae* détecté pour la première fois en Bretagne en France dans le contexte de mortalité d'huîtres plates *Ostrea edulis* (Pichot et al., 1979)
- *Bonamia exitiosa* décrit pour la première fois lors d'épisodes de mortalité d'huître *Ostrea chilensis* en Nouvelle Zélande (Hine et al., 2001)
- *Bonamia roughleyi* (Cochennec Laureau et al., 2003) initialement appelé *Mikrocytos roughleyi* (Farley et al., 1988) est considéré comme l'agent de la winter disease atteignant les huîtres *Saccostrea commercialis* sur la côte sud est australienne. L'existence de cette espèce est actuellement remise en cause par Carnegie et al. (2013) qui considèrent que *B. exitiosa* et *B. roughleyi* ne sont pas distinguables.
- *Bonamia perspora* caractérisé chez *Ostrea equestris* en Caroline du Nord n'induit pas de mortalité chez cette espèce et présente une exception au sein du genre *Bonamia* en formant des spores (Carnegie et al., 2006)

Notre vision de la distribution de ces parasites a évolué ces dernières années en particulier en raison de la détection de parasites apparentés à *Bonamia exitiosa* dans différentes espèces d'huîtres et dans de nouvelles régions du monde. Contrairement à *B. ostreae* qui ne semble infecter en conditions naturelles que l'huître plate *Ostrea edulis* et dont la distribution géographique est restreinte à l'Europe et l'Amérique du Nord, *B. exitiosa* est détecté dans de nombreuses espèces d'huîtres des genres *Ostrea*, *Crassostrea* et *Saccostrea* dans plusieurs régions de monde (Europe, Amérique du Nord et du Sud, Australie, Nouvelle Zélande, Afrique du Nord) (Hill et al., 2010 ; Carnegie et al., 2013).

La transmission de l'infection est directe et n'implique pas d'hôte intermédiaire. Certaines espèces telles que l'huître creuse *Crassostrea gigas* sont cependant suspectées d'agir comme vecteur ou réservoir du parasite (Lynch et al., 2010).

La plupart des formes visibles du parasite sont unicellulaires bien qu'il soit également possible d'observer des cellules en division ainsi que des formes plasmodiales. Ces formes plasmodiales semblent régulièrement présentes dans les cas d'infection à *Bonamia exitiosa* tandis qu'elles sont plus rares dans les cas d'infection à *B. ostreae* et sont plutôt observées chez des huîtres moribondes ou mortes (Bréhelin et al., 1982). Des formes riches en ribosomes (denses aux électrons) et des formes « claires » ont été décrites en microscopie électronique à transmission (Pichot et al., 1979, Dinamani et al., 1987, Hine, 1991). Cependant la signification biologique de ces formes dans le cycle de ces parasites reste incertaine. Les deux formes du parasite présentent des particules denses structurées considérées comme équivalentes aux haplosporosomes décrits chez les Haplosporidies (Perkins, 1979). Les parasites *B. ostreae* et *B. exitiosa* sont très semblables morphologiquement. Néanmoins, la position du noyau dans la cellule, centrale pour *B. exitiosa* et excentrée pour *B. ostreae* (Figure 6) permet de les distinguer (Abollo et al., 2008).

Leur distribution est essentiellement intrahémocytaire, mais certains auteurs rapportent la présence de parasite *Bonamia ostreae* dans les cellules épithéliales et en position extracellulaire (Montes et al., 1994).

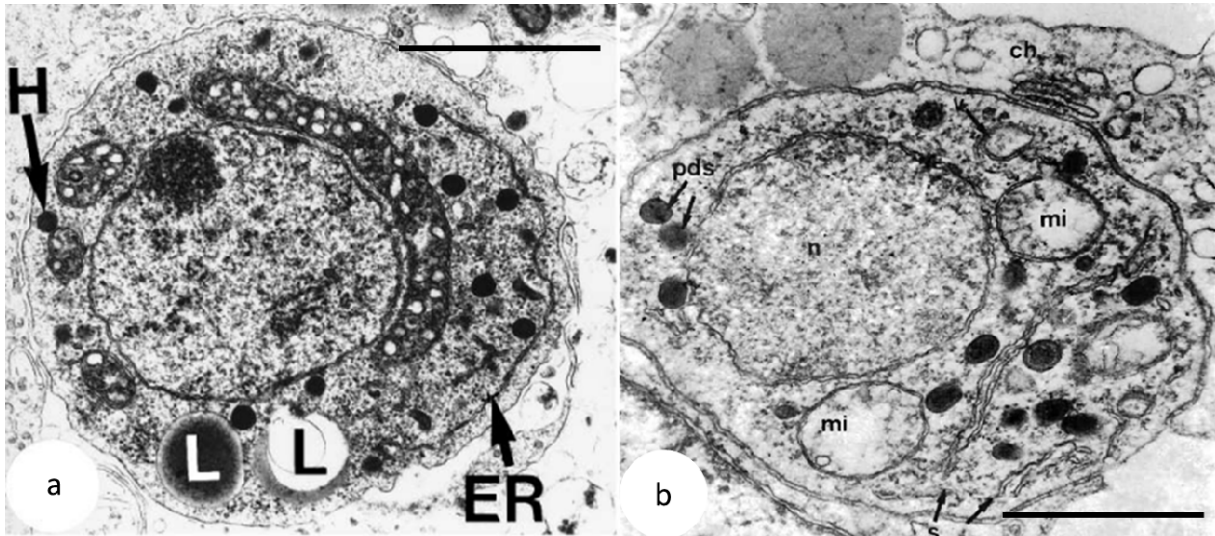


Figure 6. *Bonamia exitiosa* (a) chez *Ostrea chilensis* (Hine et al., 2001). L= corps lipidiques, H= haplosporosomes, ER= réticulum endoplasmique; On note la position central du noyau avec un nucléole excentré et les sections des mitochondries autour du noyau. *Bonamia ostreae* (b) chez *Ostrea edulis* (Pichot et al., 1979). Pds = particules denses structurées, mi= mitochondries, v= vacuole, s= saccules, ch= cellule hôte, n= noyau. On note la position excentrée du noyau. Barre = 1 μm

Un protocole d'isolement du parasite à partir d'animaux infectés a été développé par Miahle et al. (1988) et a permis la mise au point de protocole d'infection *in vitro* entre hémocytes et parasite (Mourton et al., 1992). Ce protocole a également permis de reproduire la maladie en laboratoire par injection de parasites purifiés dans des huîtres et par cohabitation entre huîtres infectées et huîtres non infectées (Hervio et al., 1995).

4. Récapitulatif

Considérant leurs différentes caractéristiques en termes de spécificité, distribution géographique, tropisme tissulaire, cycle de transmission, ... ces protozoaires présentent des intérêts particuliers pour aborder le thème des interactions entre bivalves et parasite.

Le tableau suivant récapitule les principales caractéristiques des parasites protozoaires *Perkinsus olseni*, *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*.

	<i>Perkinsus olseni</i>	<i>Marteilia refringens</i>	<i>Bonamia ostreae</i>
Groupe/Phylum-Famille	Alevolata/Perkinsozoa	Rhizaria/Paramixyda	Rhizaria/Haplosporidia
Spectre hôte	vénéridés, haliotidés, ostréidés	huître plate et moules	huître plate
Taille	De 2 à 40 µm en fonction des stades	4 à 40 µm en fonction des stades	2-3 µm <5 µm
Distribution géographique	Europe, Asie, Australie, N ^{elle} , Zélande, Polynésie, Amérique centrale et du sud	Europe, Afrique du Nord	Europe, Amérique du Nord
Cycle	Transmission directe, cycle comportant une phase de développement dans l'eau de mer	Cycle hétéroxène comprenant au moins un hôte intermédiaire (copépode <i>Paracartia grani</i>)	Transmission directe
Tropisme	Tissus conjonctifs	Epithéliums digestifs parfois branchies et tissus conjonctifs	Hémocytes
Approche expérimentales disponibles	Culture <i>in vitro</i> Infections expérimentales	Isolement des différents stades du parasite dans son hôte bivalve	Isolement du parasite Infections expérimentales <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> par injection et par cohabitation

Tableau 2. Résumé des principales caractéristiques des parasites protozoaires de bivalves *Perkinsus olseni*, *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*

B. Les bivalves

Les Bivalves sont des Mollusques au corps comprimé latéralement et enveloppé dans un repli du manteau. Ce dernier est doublé extérieurement d'une coquille constituée de deux valves, une droite et une gauche, qui délimite la cavité palléale. La fermeture et la liaison des valves sont assurées par deux muscles adducteurs antérieur et postérieur, le premier pouvant s'atrophier ou disparaître.

Ils vivent dans des milieux extrêmement variés : eaux douces, saumâtres ou milieu marin. La plupart des bivalves ont adopté un mode de vie sédentaire, voire sessile, passant souvent l'intégralité de leur vie dans la zone où ils sont arrivés lorsqu'ils étaient au stade larvaire. Il

existe également des espèces fouisseuses qui s'enterrent dans le sédiment afin de se protéger des vagues, des prédateurs, de la dessiccation, des variations excessives de température ou salinité. Les bivalves sont presque tous filtreurs vivant d'aliments réduits à l'état de particules, principalement du phytoplancton mais aussi des particules organiques comme des fragments d'animaux morts ou des micro-organismes vivants. La filtration est surtout réalisée par les branchies dont le pouvoir de rétention dépend de l'agencement, des mouvements et de la fréquence des cils branchiaux. Ceux-ci sont eux-mêmes recouverts de mucus qui favorise la retenue par adhérence des petites particules dont la taille peut être inférieure à 1 μm . L'efficacité du filtre branchial est liée à la qualité du milieu environnant.

Certains coquillages ont des sexes séparés comme la moule, la coque, la palourde, et d'autres sont hermaphrodites comme la coquille Saint Jacques ou le pétoncle. Lorsque le coquillage est hermaphrodite les éléments mâles et femelles peuvent arriver à maturité en même temps ou de façon décalée : les individus pondent alors successivement des gamètes mâles et des gamètes femelles. C'est le cas de l'huître plate qui peut être mâle puis femelle pendant le même été. Certains coquillages comme l'huître creuse *Crassostrea gigas* sont hermaphrodites protandriques.

Les bivalves marins ont une fécondation externe. Chez certaines espèces, les larves sont libres dès le début de leur vie (ex : l'huître creuse, *Crassostrea gigas*) d'autres espèces telle que l'huître plate, *Ostrea edulis*, sont larvipares et incubent les larves dans la cavité palléale. La durée de vie pélagique varie selon les espèces et les conditions du milieu. Au terme de cette phase planctonique, la larve se sédentarise au niveau du sédiment ou d'un support adapté et se métamorphose. Une réorganisation générale de tous les organes la transforme en un jeune animal semblable à l'adulte.

A l'instar des autres invertébrés, les bivalves ne produisent pas d'anticorps et sont donc dépourvus d'une immunité acquise. Cependant, de plus en plus de travaux démontrent qu'il existe une forme de mémoire et de réponse spécifique chez les invertébrés (Rowley and Powell, 2007; Schulenburg et al., 2007). Les principaux mécanismes de défense identifiés à ce jour chez les bivalves reposent donc sur l'immunité « innée » ou non spécifique. La coquille, le manteau, les branchies et le mucus constituent une première barrière contre les organismes pathogènes. La seconde ligne de défense est assurée par les composants de l'hémolymphe notamment les substances dissoutes et les hémocytes (Chu, 2000; Roch,

1999). L'immunité chez les bivalves repose sur deux actions complémentaires : d'une part les mécanismes à médiation cellulaire comme l'infiltration hémocytaire, l'encapsulation et surtout la phagocytose dont les médiateurs sont les hémocytes, et, d'autre part la défense humorale impliquant des molécules libres telles que les lectines, les cytokines, les peptides anti-microbiens ou les enzymes lysosomales.

La taxonomie des bivalves a été revisitée en 2010 (Bouchet et al., 2010) : 324 familles sont reconnues, dont 214 connues uniquement à partir de fossiles et 110 qui ont encore des représentants aujourd'hui. La classification a depuis été adoptée par WoRMS (Word Register of Marine Species).

Elles se distribuent en 4 sous classes (Heterodonta, Paleoheterodonta, Protobranchia et Pteromorpha). Les espèces qui nous intéressent plus particulièrement dans la suite du document appartiennent à la sous classe des Heterodonta (ordre Veneroidea) et à la sous classe des Pteromorpha (ordres des Ostreoida et Mytilida) (**Figure 7**).

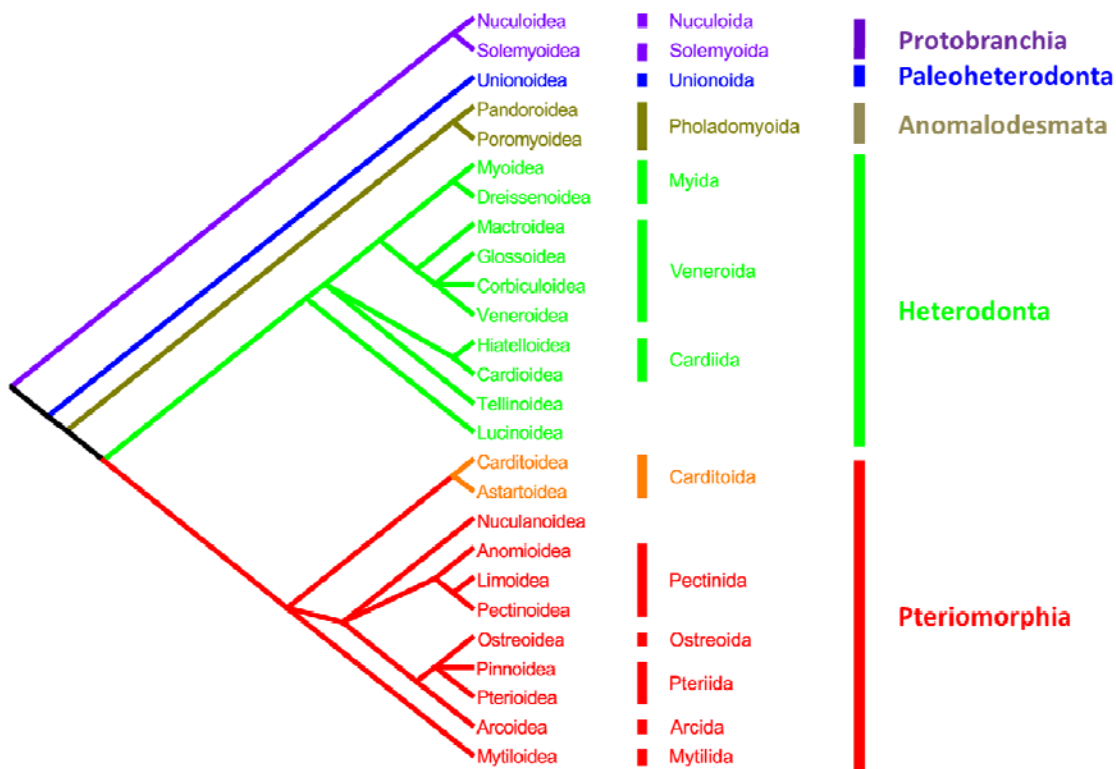


Figure 7. Phylogénie et systématique des bivalves (d'après Plazzi et al., 2011)

II. Diversité des parasites protozoaires chez les bivalves

Alors que les outils de nouvelle génération de séquençage (NGS) promettent d'améliorer notre connaissance de la diversité du monde vivant, il ne fait aucun doute que les espèces parasites, du fait même de leur mode de vie cachée sont les plus mal connues de toutes et qu'un nombre conséquent d'espèces restent à découvrir et à décrire (Poulin and Morand, 2000). Pourtant, l'identification et la distinction des espèces de parasite sont nécessaires aux études portant sur la biologie des parasites et sur les interactions avec leurs hôtes.

De nombreux protozoaires sont couramment observés chez les bivalves marins sans qu'ils soient formellement caractérisés. Des coccidies, ciliés, grégarines, mixosporidies... sont en effet rapportés, mais du fait de leur caractère opportuniste et/ou qu'ils ne répondent pas aux critères de notification tels que définis par l'OIE (Organisation Mondiale pour la Santé Animale), ils ne font pas l'objet de travaux permettant de les identifier.

Certains protozoaires ont cependant été reconnus comme affectant les populations de bivalves sauvages et d'élevage, et, à ce titre sont plus particulièrement étudiés afin de les identifier et d'évaluer leur diversité. Il s'agit principalement des parasites des genres *Haplosporidium*, *Perkinsus*, *Marteilia*, *Bonamia* et *Mikrocytos*.

Pendant longtemps, la définition d'espèce parasite a reposé sur des critères morphologiques, d'ultrastructure, de spécificité d'hôtes voire de distribution géographique. L'utilisation des outils moléculaires a permis de compléter les critères pré cités et a parfois modifié le « périmètre » de certaines espèces parasitaires.

Par exemple, l'analyse des séquences des deux espaceurs internes transcrits ITS1 et 2 de *Perkinsus olseni* et *P. atlanticus* a révélé que ces deux parasites d'ormeaux et de palourdes respectivement correspondaient à une même espèce aujourd'hui appelée *P. olseni* (Murrell et al., 2002). De même, les parasites *Perkinsus andrewsi* et *P. chesapeaki*, sur la base des données de séquences ITS, sont aujourd'hui considérés comme appartenant à une seule et même espèce *P. chesapeaki* (Dungan et al., 2002).

Les apparentes différences de spécificité d'hôte et d'ultrastructure rapportées chez *Marteilia refringens* infectant l'huître plate *Ostrea edulis* et *M. maurini* infectant les moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis* avaient dans un premier temps conduit à considérer ces espèces parasitaires comme distinctes (Comps et al., 1982). Cependant, des observations en microscopie électronique à transmission conduites ultérieurement avaient remis en cause les premières différences observées (Longshaw et al., 2001; Villalba et al., 1993c). De plus, la comparaison de données de séquences de la région des gènes codant les ARN ribosomaux, en particulier l'ARNr 18S, l'ITS1 puis l'espaceur inter génique (IGS) ne permit pas de noter des différences suffisantes pour conclure à l'existence de deux espèces (Berthe et al., 2000 ; Le Roux et al., 2001 ; Lopez-Flores et al., 2004). Aujourd'hui ces deux parasites sont considérés comme une seule et même espèce, *M. refringens*.

Dans le cadre des travaux conduits au laboratoire génétique et pathologie des Mollusques Marins sur les parasites protozoaires, des efforts ont été réalisés et se poursuivent pour identifier et caractériser de nouvelles séquences. Ces nouvelles données permettent de préciser la position phylogénétique de ces microorganismes et de développer des outils de détection adaptés. Cependant ces séquences peuvent présenter du polymorphisme qu'il est intéressant et important de caractériser.

A. Plus de gènes, c'est bien

Ainsi, les données de séquences apparaissent indispensables pour définir les espèces parasitaires et pour développer des outils de détection.

Les parasites protozoaires des huîtres ne sont généralement pas cultivables (à l'exception des parasites du genre *Perkinsus*). Il est donc difficile de disposer de matériel biologique suffisamment riche et pur pour réaliser du séquençage génomique. De fait, les données de séquences disponibles pour ces protozoaires sont essentiellement représentées par des séquences d'ADN ribosomal. La consultation des données de séquence disponibles sous GenBank en juillet 2014 pour les parasites du genre *Bonamia* révèle seulement 7 séquences autres que des séquences d'ADN ribosomal (Figure 8) tandis que les 257 séquences

disponibles pour *Marteilia refringens* correspondent exclusivement à de l'ADN ribosomal (18S, ITS et IGS, Figure 9).

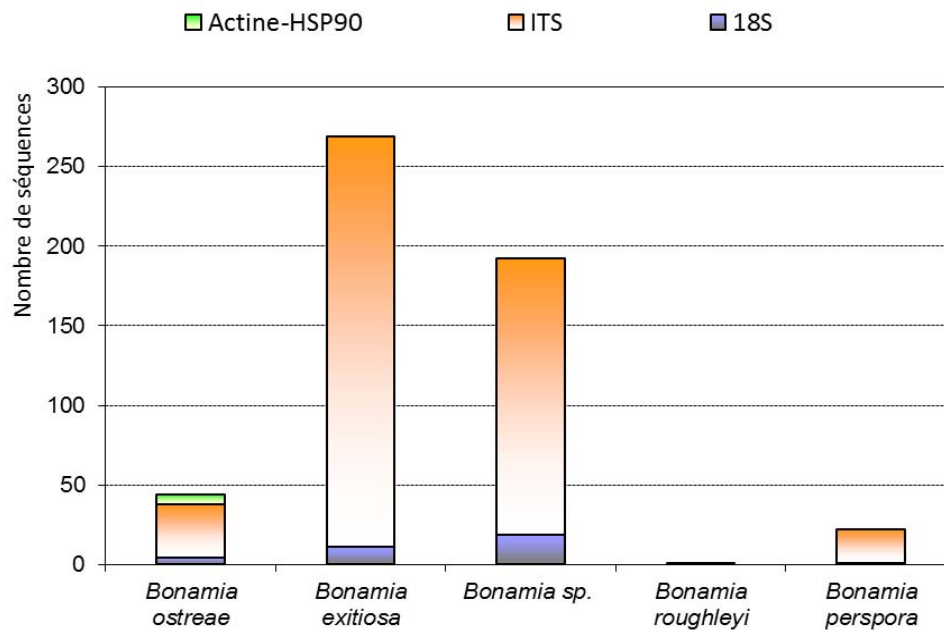


Figure 8. Séquences disponibles pour les parasites du genre *Bonamia* (Juillet 2014 GenBank)

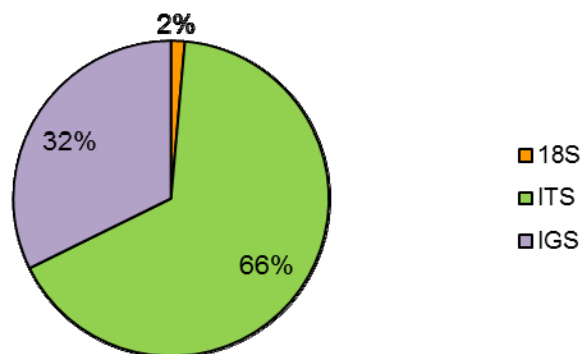


Figure 9. Séquences disponibles pour les parasites du genre *Marteilia* (Juillet 2014 GenBank)

Afin d'augmenter le nombre de séquences disponibles pour *Bonamia ostreae*, trois approches ont été utilisées : l'utilisation d'amorces dégénérées, l'amplification d'ADNc et du RNAseq.

1. Utilisation d'amorces dégénérées

L'actine est une protéine ubiquiste et l'une des mieux conservées chez les eucaryotes (Sheterline and Sparrow, 1994). La combinaison d'amorces ciblant des régions conservées chez les eucaryotes et d'amorces amplifiant des organismes proches de *Bonamia ostreae* tels que les haplosporidies (Reece et al., 2004, 1997) et les rhizopodes (Longet et al., 2004) nous a permis d'identifier et de caractériser deux gènes d'actine de *Bonamia ostreae* (Lopez-Flores et al., 2007). Les protéines d'actine sont généralement codées par une famille multigène et présentent le plus souvent des introns. Chez d'autres protozoaires tels que *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, les haplosporidies *Haplosporidium louisiana* ou *Minchinia tapetis*, 2 à 4 gènes d'actine ont été décrits (Pawlowski et al., 1999; Reece et al., 2004). Les deux gènes identifiés chez *Bonamia ostreae* (Bo-Actines 1 et 2) n'ont pas d'intron et présentent une divergence de 13%.

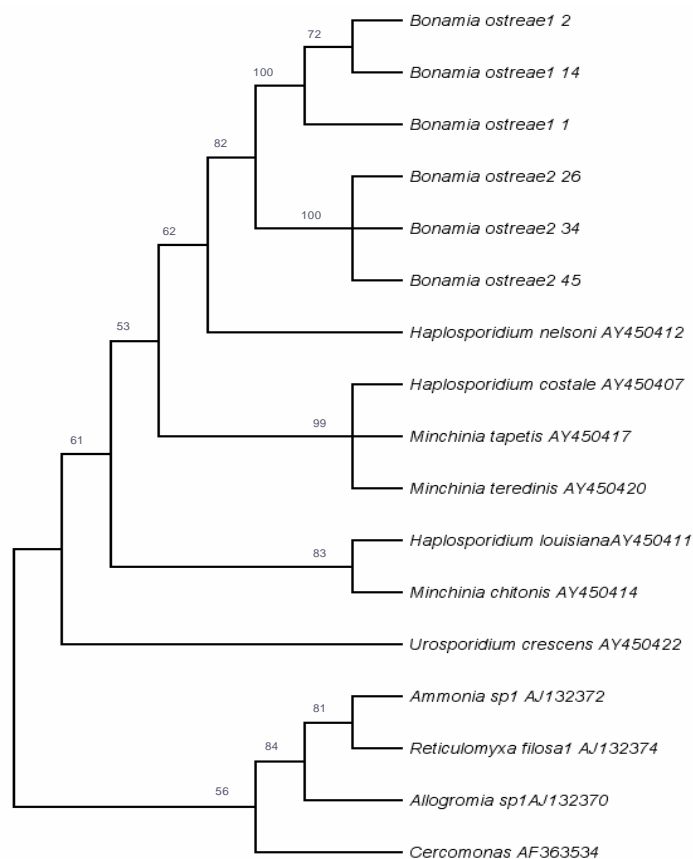


Figure 10. Analyse phylogénétique (Maximum de parcimonie) des séquences (aa) d'actine des Haplosporidies (Lopez-Flores et al., 2007)

L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques et en amino acides obtenues ainsi que des séquences d'autres espèces des genres *Haplosporidium*, *Minchina* et *Urosporidium* a montré que Bo-Actines 1 et 2 étaient deux gènes paralogues (Figure 10). Ainsi ces deux gènes seraient issus d'une duplication survenue après différenciation de *B. ostreae*. L'analyse phylogénétique réalisée a par ailleurs confirmé la position du parasite au sein des haplosporidies (Lopez-Flores et al. 2007).

2. Caractérisation de gène à partir d'ADNc

Récemment, un gène codant une Heat Shock Protein 90 (HSP90) a été caractérisé par Amplification Rapide d'extrémités d'ADN complémentaires (RACE = Rapid Amplification of cDNA Ends) obtenus après extraction d'ARN à partir d'hémocytes infectés par *Bonamia ostreae*.

Les HSP90 sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la stabilisation de nombreuses protéines comme les kinases, les facteurs de transcription et les molécules de signalisation (Hahn, 2009; Pratt and Toft, 2003; Yahara, 1999). D'un point de vue évolutif, les HSP sont considérées comme très utiles pour les études phylogénétiques car elles sont conservées chez les procaryotes et eucaryotes (Chen et al., 2006; Fast et al., 2002). Les eucaryotes supérieurs ont deux isoformes d'HSP90 cytosoliques inductibles et trois HSP90 spécifiques d'organelle dans les chloroplastes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Les HSP90 de parasite sont impliquées dans le développement des stades infectieux et l'invasion cellulaire par des parasites des genres *Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* et *Eimeria* (e.g. Ahn et al., 2003; Echeverria et al., 2005; Wiesgigl and Clos, 2001). En raison de leur implication dans les processus infectieux, les HSP90 ont été proposées comme des cibles pour le développement de thérapie antiparasitaire (Neckers and Tatu, 2008).

La HSP90 caractérisée chez *Bonamia ostreae*, BoHSP90, n'a pas de peptide signal et comporte 728 acides aminés (Prado-Alvarez et al., 2013a). Une étude basée sur la caractérisation des HSP90 cytosoliques à travers tout le règne vivant a révélé la présence de

12 motifs conservés (Chen et al., 2006), motifs retrouvés chez BoHSP90. Si quatre de ces motifs sont exactement conservés, les 8 autres présentent quelques différences telles que le motif MEEVD dans la région C-terminal qui présente une substitution (acide aspartique à la place du premier acide glutamique). Le motif MEEVD est impliqué dans les interactions protéine-protéine et dans la reconnaissance des domaines TRP (Tetra-Trico peptide Repeat) trouvé dans les co-chaperones (D'Andrea and Regan, 2003).

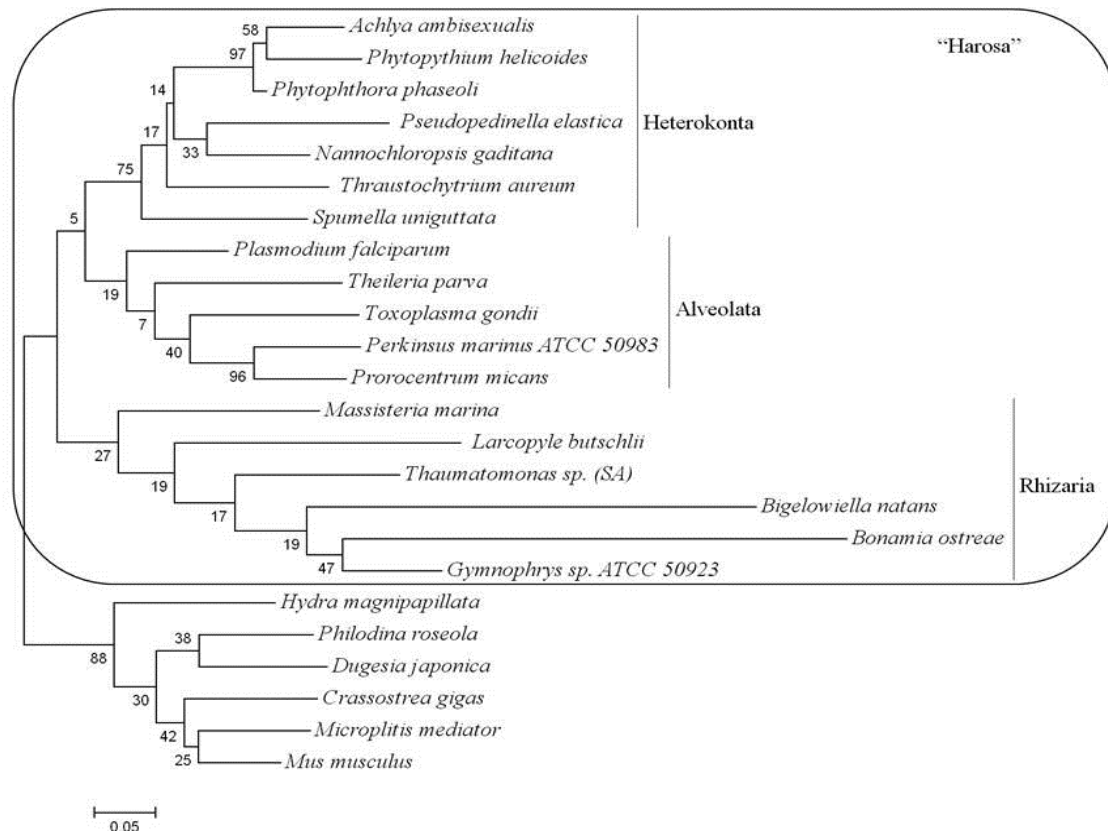


Figure 11. Analyse phylogénétique (Maximum de vraisemblance) des séquences (aa) partielles de HSP90 d'eucaryotes (Prado-Alvarez et al., 2013a)

En raison du faible nombre de séquences complètes disponibles pour cette protéine chez les protistes, une analyse a été conduite sur des séquences partielles. BoHSP90 apparaît alors dans le groupe des rhizaria, un groupe distinct des Alveolata et Heterokonta (Figure 11). Au sein des Rhizaria, *B. ostreae* semble (47% bootstrap) plus proche du Cercozoa *Gymnophrys* sp. Ces résultats vont dans le sens des conclusions de Cavalier-Smith (2002) et Cavalier-Smith et Chao (2003) qui positionnent les haplosporidies dans les Cercozoa.

BoHSP90 est le premier gène complètement caractérisé de HSP90 cytosolique chez les Rhizaria (Prado-Alvarez et al., 2013a) ce qui ouvre quelques perspectives d'intérêt pour mieux comprendre le positionnement de ce groupe au sein de l'arbre des eucaryotes.

Enfin, l'identification de ce gène nous a conduits à réaliser des études complémentaires afin de déterminer le rôle potentiel de BoHSP90 dans le développement de l'infection. Des parasites *Bonamia ostreae* ont été exposés à différentes concentrations de radicicol, inhibiteur de Hsp90, avant d'être mis en contact avec des hémocytes d'huître plate. Les parasites traités au radicicol sont moins internalisés dans les hémocytes que lorsqu'ils ne sont pas traités. Ces résultats mettent en évidence l'implication de BoHSP90 dans l'infection des hémocytes (Prado-Alvarez et al., 2013a ;Figure 12)

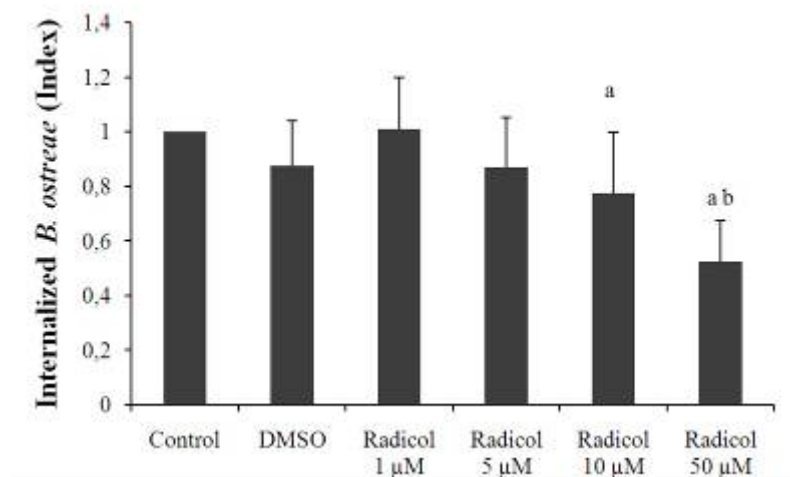


Figure 12. Effet du radicicol sur l'internalisation du parasite *B. ostreae* dans les hémocytes. Index= nombre d'hémocytes infectés en condition testée/nombre hémocytes infectés en condition contrôle (parasite non traité) (Prado-Alvarez et al., 2013a)

3. RNA seq

Afin d'acquérir d'avantage de données moléculaires pour le parasite protozoaire *Bonamia ostreae*, une approche de RNA-seq a été envisagée dans le cadre du projet européen Aquagenet (Interreg IVB SUDOE). Les nouvelles technologies de séquençage permettent aujourd'hui l'analyse qualitative et quantitative du transcriptome (RNA-seq). Si cette technologie est déjà utilisée pour étudier les ARNs chez les métazoaires, un certain nombre de travaux ont également été réalisés sur des protozoaires cultivables comme *Trypanosoma brucei* (Michaeli et al., 2012), *Plasmodium falciparum* (Sorber et al., 2011), *Tetrahymena thermophila* (Xiong et al., 2012). L'analyse de transcriptomes de protistes non cultivables tels que *Mikrocytos mackini* a récemment permis d'obtenir de nouvelles séquences d'intérêt pour l'étude de l'évolution des Rhizaria (Burki et al., 2010).

Ne disposant pas de génome de référence pour *Bonamia ostreae* ni de génome disponible pour un organisme proche et confrontés à l'impossibilité d'obtenir une suspension pure de parasites (exempte de bactéries notamment), l'approche RNA-seq a été envisagée pour obtenir de nouvelles séquences et écarter les ARN non polyadénylés de procaryotes.

La première étape a consisté à obtenir des parasites purifiés selon le protocole de Miahle et al. (1988) en quantité suffisante pour optimiser l'étape d'extraction d'ARN. Neuf expériences d'isolement des parasites à partir d'huîtres fortement infectées ont ainsi été réalisées permettant l'obtention de $6 \cdot 10^9$ parasites. Après avoir contrôlé l'absence d'ADN du parasite et d'ARN de l'hôte dans nos préparations, les librairies ont été préparées à la plateforme Génotoul de l'INRA, Auzeville.

L'étape de séquençage a été réalisée à l'aide d'un appareil HiSeq2000 Illumina en pair-ends. Ainsi plus de $377 \cdot 10^6$ séquences de 100 pb ont été obtenues, correspondant à 38.1 Gb. La qualité de ces séquences a permis l'assemblage de 11 042 contigs (=14 MB) présentant des N50 et N90 de 1734 et 642 bases respectivement. Ces données sont aujourd'hui en accès restreint sur un portail de l'INRA Genotoul.

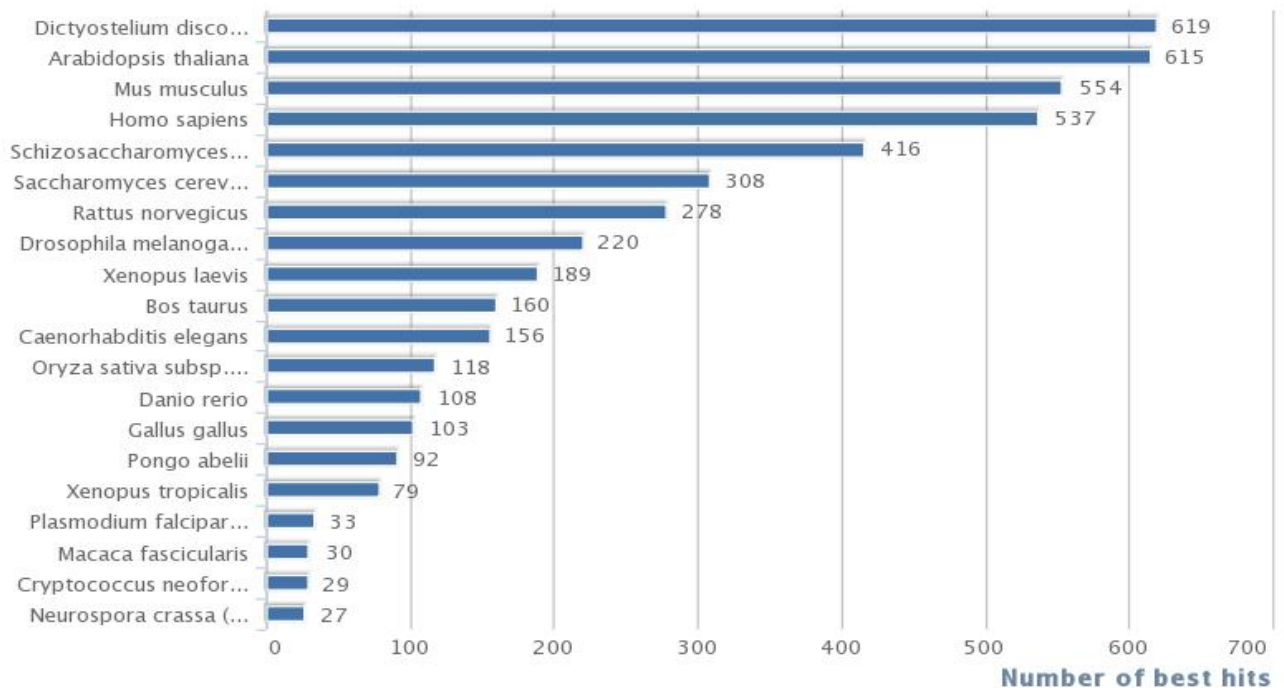


Figure 13. Nombre des meilleures identités obtenues par organisme après recherche d'identité des contigs de *Bonamia ostreae* dans les banques de données publiques.

Les premières analyses de séquences réalisées en collaboration avec Christophe Klopp (Unité de Mathématiques et Informatique Appliquées, Toulouse) montrent que moins de 4% des contigs présentent une homologie avec des gènes d'huître. Ce résultat indique que les préparations de départ étaient peu contaminées par des composants de l'hôte. Comme l'indique la Figure 13, 5,6% des contigs présentent une forte homologie avec des gènes d'un protozoaire, une amibe vivant dans le sol, *Dictyostelium discoideum*. Il est également intéressant de noter qu'une trentaine de contigs paraissent proches de gènes de *Plasmodium falciparum*, un protozoaire parasite agent du paludisme chez l'homme.

Les analyses des séquences obtenues sont toujours en cours et offrent des perspectives intéressantes pour identifier de nouveaux gènes pouvant être utilisés comme cibles pour le développement de nouveaux outils diagnostiques mais aussi pour mieux comprendre la biologie du parasite et ses interactions avec son hôte. Ce travail nous a amenés à collaborer avec une équipe suisse travaillant sur l'évolution des rhizaria, qui utilise actuellement nos données pour mieux comprendre leur position relative au sein des protozoaires. Les données acquises au cours de ce projet constituent le premier jeu de séquences disponibles pour un membre de la famille des *Haplosporidia*.

B. Développement d'outils diagnostiques

Alors que nos connaissances des génomes parasites évoluent, de nouvelles techniques se développent et sont de plus en plus largement utilisées par les laboratoires impliqués dans la surveillance des maladies des mollusques. Cependant, avant de pouvoir transférer un outil diagnostique, il est nécessaire de vérifier ses performances en termes de sensibilité et spécificité analytiques et de le valider. Cette étape de validation permet d'apprécier la capacité de l'outil diagnostique à détecter les animaux réellement infectés tout en présentant le minimum de variation entre manipulateurs et laboratoires. Une partie des activités menées dans le cadre du LRUE concerne le développement, la validation et le transfert d'outils diagnostiques. Ces dernières années, nos efforts ont porté sur le développement d'essais de PCR en temps réel. Ces outils sont de plus en plus couramment utilisés par les laboratoires d'analyses en raison de leur plus grande sensibilité, de leur rapidité et du fait qu'ils présentent moins de risques de contamination que les essais de PCR conventionnelle. Dans cette partie, sont présentés deux exemples d'essais de PCR en temps réel développés pour la détection de *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*.

1. PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *Bonamia ostreae*

Le genre *Bonamia* comporte plusieurs espèces telles que *B. ostreae*, *B. exitiosa* ou *B. perspora* et un certain nombre de représentants non complètement caractérisés appelés *Bonamia* sp. Les régions 18S et ITS1 de ces parasites ont souvent été la cible d'essais de PCR (Abollo et al., 2008; Carnegie et al., 2006, 2000; Cochenec et al., 2000; Corbeil et al., 2006a; Engelsma et al., 2010; Hill et al., 2010; Marty et al., 2006). La plupart des outils diagnostiques développés sur ces régions ne sont pas spécifiques au niveau de l'espèce mais au niveau du genre.

Suite à la caractérisation des gènes d'actine de *Bonamia ostreae* présentée en partie III-A-1 (Lopez-Flores et al., 2007), un essai de PCR en temps réel pour la détection spécifique de

Bonamia ostreae a été développé (Robert et al., 2009). La spécificité analytique de cet outil a été démontrée par l'absence d'amplification de parasites proches de *B. ostreae* tels que *B. exitiosa*, *Bonamia* sp., *Haplosporidium armoricanum*. De plus, des échantillons détectés infectés par *B. ostreae* ont présenté des résultats positifs avec une courbe de dissociation similaire et un pic à $81.7^{\circ}\text{C} \pm 0.21^{\circ}\text{C}$ (Figure 14). La sensibilité de cet essai de PCR a été testée en analysant des gammes de dilutions d'ADN plasmidique en eau et complexifiée en présence d'ADN d'huître non infectée mais également en analysant des dilutions d'ADN extraits d'huîtres infectées. La PCR en temps réel apparaît plus sensible (au moins 10 fois) que la PCR conventionnelle (ici selon Cochenec et al. (2000)).

Cet essai de PCR a également été comparé à des techniques de référence : la cytologie par apposition de tissus cardiaques et la PCR conventionnelle (Cochennec et al. 2000). Sur 132 huîtres plates analysées par les trois techniques, 86% ont présenté des résultats concordants. La PCR en temps réel a en effet permis d'observer une amplification spécifique mais tardive ($\text{CT} < 34.2$) dans 19 échantillons détectés négatifs par les deux autres outils.

Enfin, l'utilisation d'une courbe standard d'ADN plasmidique nous a permis de proposer cet essai comme un outil de quantification. Cet outil a été comparé à la cytologie par apposition de tissus cardiaques (Figure 14). Les résultats obtenus montrent une bonne corrélation (coefficient de corrélation de Pearson : 0.9 ; $p < 0.0001$) entre les deux techniques.

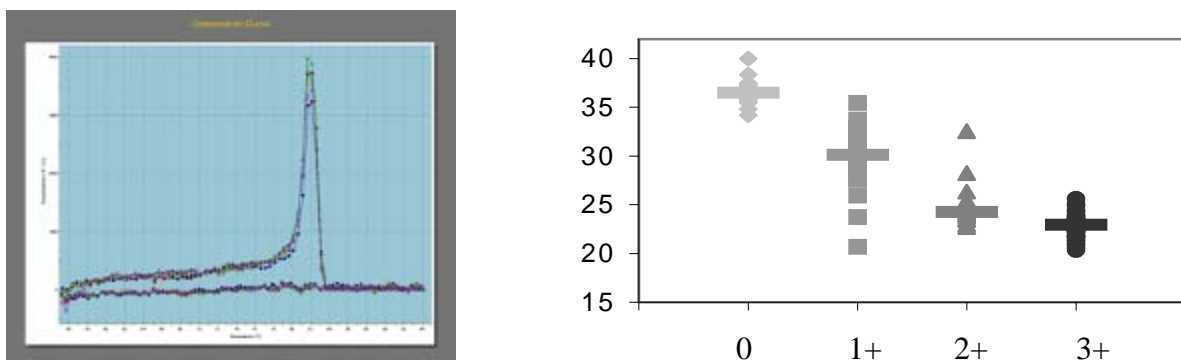


Figure 14. a) Courbe de dissociation des produits de PCR en temps réel obtenus pour *Bonamia ostreae* (pic à 81°C). b) Moyennes des CTs (cycles seuils) obtenus en fonction des niveaux d'infection déterminés par lecture d'apposition de tissus cardiaques (0=non infecté; 1+= faiblement infecté; 2+= modérément infecté; 3+= fortement infecté).

Nous disposons ainsi d'un outil de diagnostic spécifique de *Bonamia ostreae* qui nous permet également d'estimer la quantité d'ADN parasitaire présent. Cet essai de PCR en temps réel apparaît comme un outil de choix pour étudier la distribution du parasite dans

son hôte et pourrait être adapté pour être appliqué sur des échantillons environnementaux et ainsi quantifier le parasite en dehors de son hôte (colonne d'eau, sédiments...).

2. PCR en temps réel pour la détection et le typage de *Marteilia refringens*

Le parasite protozoaire *Marteilia refringens* a pour la première fois été décrit en 1969 en association à des mortalités d'huîtres plates *Ostrea edulis* dans les abers en Bretagne. Il a depuis été détecté dans de nombreux sites conchylicoles en Europe et dans le bassin méditerranéen. Deux types de *M. refringens* ont été définis sur la base d'un dimorphisme présent au niveau d'un des sites reconnus par l'endonucléase *HhaI* dans la région ITS 1: *M. refringens* type O plus souvent détecté chez l'huître plate et *M. refringens* type M plus souvent détecté chez les moules (Le Roux et al., 2001).

L'infection à *Marteilia refringens* type M comme type O est aujourd'hui une maladie à déclaration obligatoire auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE, 2014) et de l'Union Européenne (Directive 2006/088/EC). Considérant la présence possible de ces deux types dans de nombreuses espèces bivalves et zooplanctoniques, et l'intérêt de les détecter tout en les distinguant, nous avons développé un essai PCR en temps réel utilisant la chimie TaqMan pour la détection et le typage simultané de *M. refringens* type M et O.

Cet outil duplex repose sur l'utilisation d'un seul couple d'amorces et de deux sondes, l'une spécifique du type O, l'autre du type M. Nous avons pu optimiser les conditions de l'essai et travaillons aujourd'hui sur la validation de l'outil notamment dans le cadre d'une collaboration (projet PABIMAR) avec le laboratoire de l'IRTA, Catalogne, Espagne.

La limite de détection est définie en réalisant des dilutions d'ADN plasmidiques préalablement construits en intégrant le fragment cible type M et type O dans des vecteurs plasmidiques (Topo TA cloning kit, Invitrogen). La limite de détection a été évaluée à 1 copie d'ADN plasmidique quel que le soit le type de parasite lorsque l'ADN est dilué dans de l'eau et varie de 5 à 10 copies lorsque l'ADN plasmidique est complexifié avec de l'ADN extrait d'huître plate.

La spécificité de l'outil a été vérifiée en testant des échantillons de bivalves infectés avec des parasites proches de *Marteilia refringens* comme *Marteilioïdes chungmuensis*, *Marteilia*

cochillia, *Marteilia sydneyi* ou plus éloigné tel que *Haplosporidium armoricatum*. Aucune amplification n'a été observée, ce qui nous permet de confirmer que cet outil est spécifique de *M. refringens*.

Des lots d'huîtres plates, de moules, de zooplancton et d'huîtres creuses ont été analysés en PCR conventionnelle (Le Roux et al. 2001) et avec cet outil afin de comparer les résultats obtenus. Les résultats sont généralement concordants et doivent être analysés afin de déterminer la spécificité et sensibilité diagnostiques de l'essai de PCR.

Un essai inter laboratoire est prochainement envisagé afin d'apprécier la variabilité inter laboratoires et de finaliser la validation de cet outil avant de le transférer aux laboratoires intéressés.

Nous disposons ainsi d'un outil de diagnostic spécifique de *Marteilia refringens* et qui nous permet de typer le parasite détecté. Cet essai de PCR en temps réel apparaît ainsi comme un outil d'intérêt pour étudier la distribution du parasite et les flux des deux types M et O entre les différentes populations infectées au sein d'un écosystème.

C. Un parasite peut en cacher un autre

L'utilisation de plus en plus généralisée d'outils moléculaires pour la détection et la caractérisation des parasites a considérablement accru l'identification d'espèces dites cryptiques (Clark, 2000; Poulin, 2011), c'est-à-dire des espèces génétiquement distinctes mais très proches morphologiquement. De par leur ressemblance et le fait que des espèces partagent les mêmes habitats, en l'occurrence les mêmes hôtes, certains parasites protozoaires de mollusques peuvent être difficiles à détecter. Or, l'identification des espèces parasitaires présentent des implications en termes de diagnostic, épidémiologie et compréhension des interactions hôte-pathogène.

1. Caractérisation moléculaire des parasites du genre *Bonamia* en Europe

Jusqu'en 2007, le diagnostic de la bonamiose reposait essentiellement sur des méthodes microscopiques telles que cytologie par apposition ou histologie. Les parasites de type

« microcell » observés dans des hémocytes d'huîtres plates en Europe étaient considérés comme *Bonamia ostreae*. Pourtant, en Octobre 2007, pour la première fois en Europe, *B. exitiosa* a été rapporté chez l'huître plate *Ostrea edulis* en Galice (Abollo et al., 2008). Suite à cette notification, le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour les maladies des mollusques a initié avec le soutien de la Commission Européenne un programme d'étude sur la distribution de ce parasite en Europe. Cette proposition prévoyait une phase de sélection des huîtres détectées infectées par histologie ou cytologie et une phase de caractérisation moléculaire des parasites détectés par PCR et séquençage. De plus, considérant les cas de co-infections (détection des deux espèces de parasite au sein d'une même population voire d'une même huître) rapportés en Galice (Abollo et al. 2008), une étape de clonage de produits de PCR avant séquençage était recommandée afin de maximiser les chances de détection d'une espèce minoritaire.

Après trois ans d'investigation dans les pays concernés par la présence de parasites du genre *Bonamia*, *B. exitiosa* a été détecté :

- en Espagne en Galice (Abollo et al. 2008), et plus récemment Delta de l'Ebre (Carrasco et al., 2012)
- en Italie sur la côte adriatique dans le golfe de Manfredonia (Narcisi et al., 2010), et dans la région de Veneto
- en France en mer Méditerranée (Corse et au large de l'Etang de Thau) ; dans une nurserie de la Baie de Bourgneuf et dans un prélèvement de larves de la baie de Quiberon
- Au Royaume Uni en Cornouailles (River Fall) en décembre 2010

Par ailleurs, nous avons été sollicités en 2009 pour détecter et caractériser des parasites du genre *Bonamia* sur des huîtres plates provenant de Turquie, 25% des animaux analysés étaient infectés par *B. exitiosa*. Enfin, le parasite a aussi été détecté chez des huîtres provençales *Ostrea stentina* en Tunisie (Hill et al., 2010).

L'ensemble de ces données nous permet de proposer la Figure 15 comme carte de distribution de *Bonamia exitiosa* en Europe et sur le pourtour du bassin méditerranéen. Elle est susceptible d'évoluer dans la mesure où les analyses réalisées ne permettent pas de conclure que les sites où *B. exitiosa* n'a pas encore été détecté sont indemnes du parasite.

Le statut de *Bonamia exitiosa* vis-à-vis des textes réglementaires est aujourd'hui discuté. En effet, précédemment considéré comme agent à déclaration obligatoire exotique, il ne peut être aujourd'hui maintenu dans cette liste.

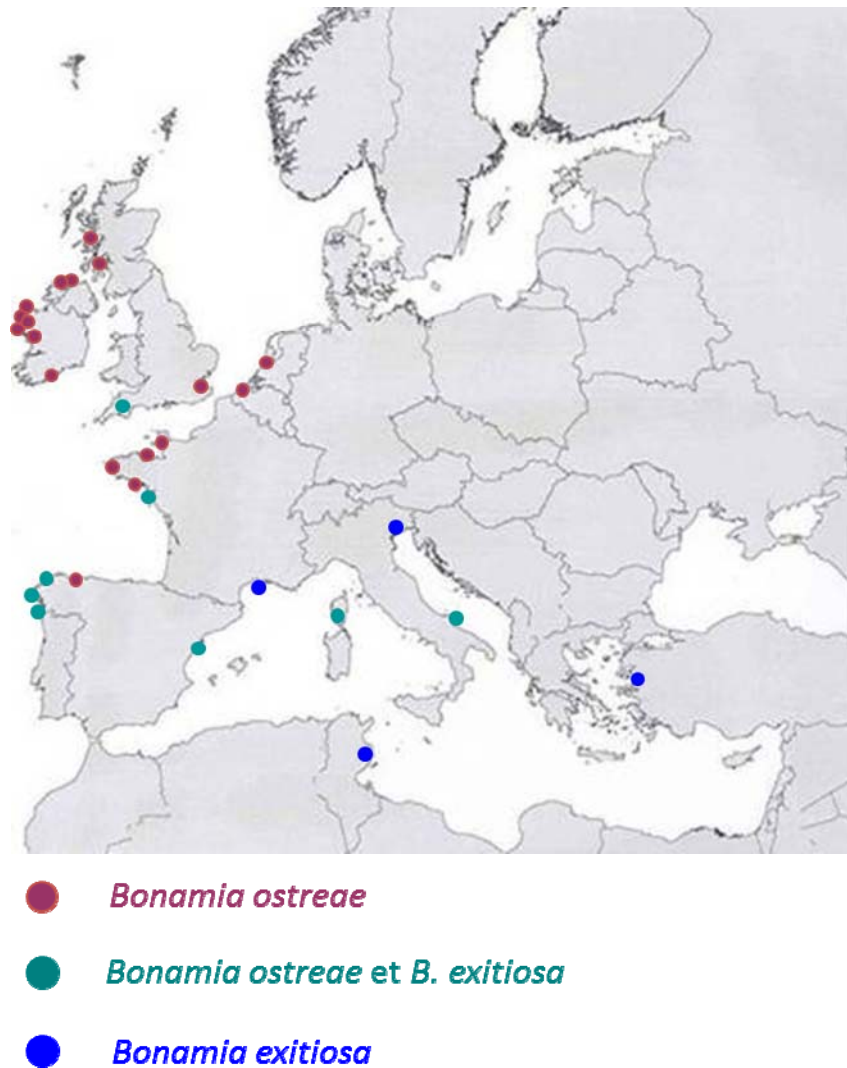


Figure 15. Distribution des parasites *Bonamia ostreae* et *B. exitiosa* en Europe et sur le pourtour du bassin méditerranéen (version juin 2014)

Afin d'étudier la variabilité potentielle des parasites du groupe *Bonamia exitiosa*, différents échantillons collectés lors de cette étude ainsi que des échantillons provenant de Nouvelle Zélande et Chili ont été sélectionnés pour des analyses complémentaires en séquençage.

Un fragment de 1300 pb incluant une partie du 18S, l'ITS1, le 5.8S et l'ITS2 a été séquencé pour 38 échantillons. Une analyse phylogénétique des séquences obtenues a été réalisée

(Figure 16). Des séquences disponibles sous GenBank et représentant *Bonamia ostreae*, *B. perspora* et des parasites du genre *Minchinia* ont été également inclus dans l'analyse.

Les résultats obtenus mettent en évidence une grande homogénéité des séquences de *Bonamia exitiosa* provenant d'Europe et du Bassin méditerranéen. Ces parasites apparaissent très proches de *B. exitiosa* de Nouvelle Zélande tandis que les échantillons du Chili semblent se détacher de ce groupe (Figure 16).

Les approches suivies pour la détection de *Bonamia exitiosa* n'étant pas homogènes entre pays, il n'est pas possible de comparer les prévalences ni de discuter des fréquences de co-infection. Cependant, nous pouvons noter que les deux espèces de *Bonamia* apparaissent sympatriques dans de nombreux sites, que lorsqu'une seule espèce est détectée, il s'agit le plus souvent de *B. ostreae* et que le plus souvent en cas de co-infection, *B. ostreae* apparaît majoritaire.

Les données disponibles soulignent la large distribution géographique et le large spectre d'hôtes de *Bonamia exitiosa* au sein des Ostreidés infectant des représentants des genres *Ostrea*, *Saccostrea* et *Crassostrea*. Au contraire l'aire de distribution de *B. ostreae* apparaît plus restreinte et le spectre d'hôte naturel de ce parasite se résume aujourd'hui à une seule espèce *Ostrea edulis*. La détection de *B. exitiosa* en Europe pose des questions quant à son origine et quant à son impact potentiel sur l'huître plate en Europe. Cet impact paraît aujourd'hui difficile à évaluer dans la mesure où le plus souvent il infecte les mêmes populations d'huîtres que *B. ostreae*.

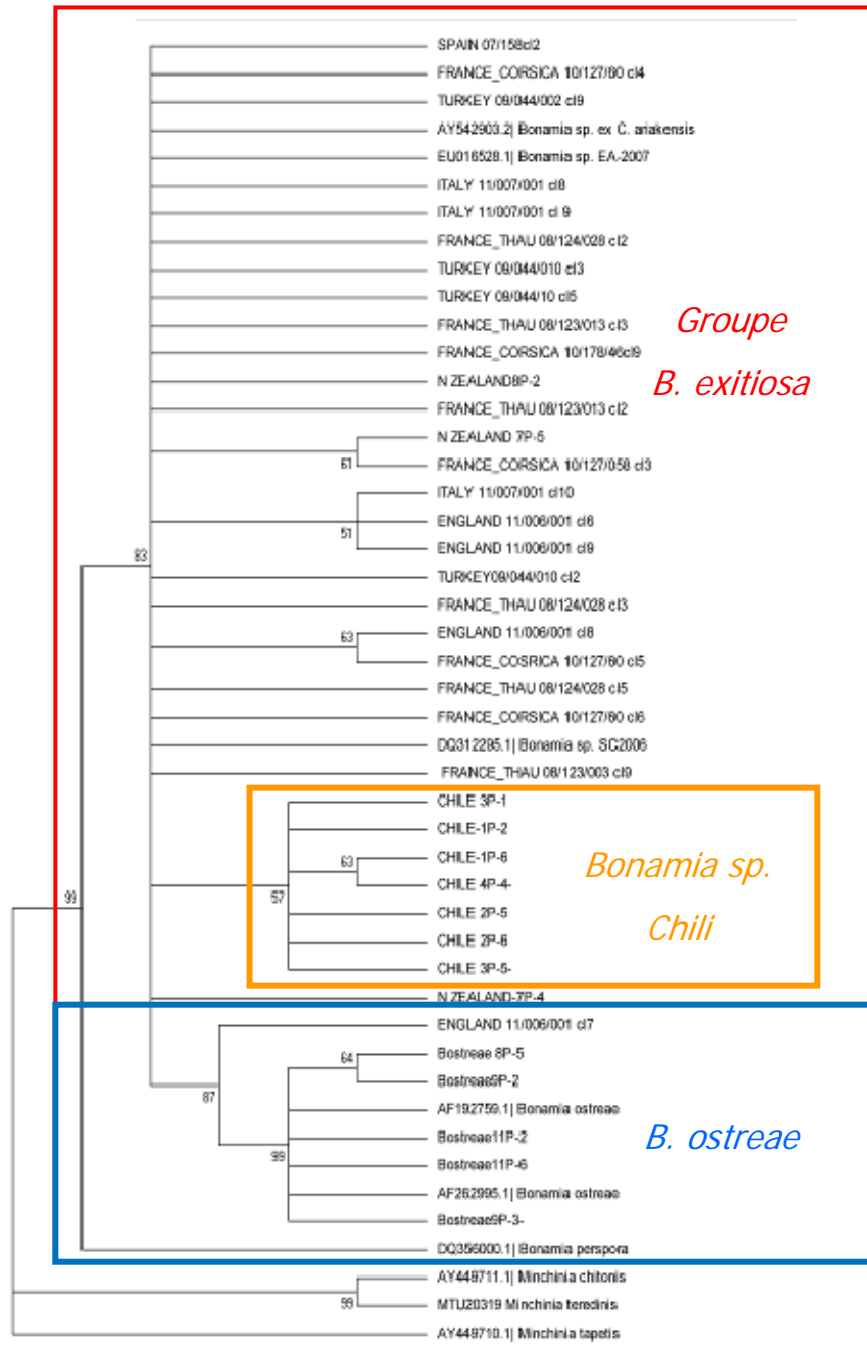


Figure 16. Analyse phylogénétique (Maximum de parcimonie) de la région 18S-ITS1-5.8S-ITS2 des parasites du groupe *Bonamia exitiosa* infectant des huîtres en Europe, Chili et Nouvelle Zélande.

2. Caractérisation moléculaire des parasites du genre *Perkinsus*

Aux termes du projet européen WOPER, il avait été recommandé de préciser les espèces de parasites du genre *Perkinsus* présents en Europe. En effet, jusqu'alors, leur diagnostic reposait sur l'histologie ou la culture en milieu thioglycollate, des outils ne permettant pas l'identification spécifique du parasite. Des travaux réalisés aux Etats-Unis et en Asie avaient révélé l'existence de plusieurs espèces de *Perkinsus* au sein de populations de palourdes. Une étude a donc été entreprise en 2007-2008 afin de caractériser les espèces présentes en France. En 2004-2005, une étude avait été réalisée dans le cadre du réseau national de surveillance des maladies des mollusques (REPAMO) pour établir la prévalence et les niveaux d'infection à *Perkinsus* dans les principaux centres français de production de palourdes, *Venerupis decussata* (= *Ruditapes decussatus*) et *V. philippinarum* (= *R. philippinarum*). Cette étude avait montré que tous les sites étaient infectés avec des prévalences souvent très élevées.

Afin de compléter ces données de distribution de prévalence de l'infection, il a été proposé de caractériser les espèces présentes dans ces secteurs. Les analyses réalisées ont permis d'obtenir des informations pour quatre secteurs : Leucate, Arcachon, Bonne Anse, et le Golfe du Morbihan (Arzul et al., 2012).

L'approche utilisée reposait sur la caractérisation de la région ITS-1 du génome parasitaire et comportait une étape de clonage. Une dizaine de clones a été analysée par individu de façon à vérifier la possible présence de co-infection dans les palourdes testées. Cette étude nous a permis de montrer que *Perkinsus olseni* est présent dans tous les secteurs investigués et que la région du génome étudiée présente très peu de variabilité. En outre, pour la première fois en Europe nous avons décrit la présence de *P. chesapeaki* dans l'étang de Leucate et sur le site de Bonne Anse en Charente Maritime. Il s'avère que *P. olseni* et *P. chesapeaki* co-infectent les mêmes gisements de palourdes et parfois les mêmes individus. La détection de *P. chesapeaki* étant inattendue, des analyses complémentaires de séquençage, de culture et d'hybridation *in situ* ont été envisagées afin de confirmer ces résultats.

Des cultures clonales pour les deux espèces *Perkinsus olseni* et *P. chesapeaki* ont été obtenues en milieu DMEM/Ham's (milieu Dulbecco's modified Eagle's/Ham's F12 (1:2)) selon un protocole précédemment publié (Gauthier and Vasta, 1995; Ordas and Figueras, 1998).

Ces cultures ont été utilisées afin de séquencer deux autres régions du génome de ces parasites : un gène codant l'actine et le gène codant l'ARN 28S. Les séquences obtenues pour le gène d'actine présentent 98% d'identité avec l'actine -1 de *P. chesapeaki* (AY876361) et 100% d'identité avec *P. olseni* (AY876352). Les séquences de l'ARN 28S obtenues présentent 99% d'identité avec *P. olseni* (AY876332) et 99% d'identité avec *P. chesapeaki* (AY876347). Ces résultats ont ainsi permis de confirmer ceux obtenus sur la base des séquences ITS.

De plus, les cultures clonales développées ont fait l'objet d'une étude descriptive comparative (Figure 17). Les stades majoritairement observés ; trophozoïtes et schizontes étaient plus petits dans les cultures de *Perkinsus olseni* que *P. chesapeaki*. Par ailleurs, les stades zoosporanges apparaissent plus nombreux pour *P. chesapeaki* (18%) que pour *P. olseni* (0.2%). Les différences observées ne permettent en aucun cas de conclure quant aux espèces observées mais confirment qu'il s'agit bien d'isolats distincts et vont dans le sens de données disponibles dans la littérature (Burreson et al., 2005; Casas et al., 2002; Dungan and Reece, 2006). Enfin, des palourdes prélevées à Sables Leucate ont été analysées en hybridation *in situ* en utilisant des sondes spécifiques de *P. olseni* et *P. chesapeaki* (Moss et al., 2006 ; Reece et al., 2008) afin de confirmer les résultats de co-infection obtenus par séquençage après clonage.

La présence de *Perkinsus chesapeaki* et *P. olseni* a été confirmée dans 83% et 100% des palourdes testées respectivement. Dans les palourdes détectées infectées par les deux espèces, *P. olseni* semblait plus abondant, plus largement distribué et plus souvent associé à des infiltrations hémocytaires que *P. chesapeaki*.

La détection de *Perkinsus chesapeaki* pose des questions quant à l'origine de sa présence en France et quant à son impact potentiel sur les bivalves en Europe. En effet, *P. chesapeaki* a été associé à des mortalités de myes, *Mya arenaria* en baie de Chesapeake (Dungan et al., 2002; McLaughlin and Faisal, 1999; McLaughlin et al., 2000) et des mortalités de couteaux *Tagelus plebeius* en baies de Chesapeake et Delaware (Bushek et al., 2008; Dungan et al., 2002) aux Etats-Unis. La synonymization de *P. chesapeaki* et *P. andrewsi* initialement caractérisé chez *Macoma balthica* dans le Maryland (Coss et al., 2001) a conduit à élargir les spectres d'hôtes et géographique de cette espèce (Burreson et al., 2005; Reece et al., 2008). Nos résultats constituent cependant la première description de *P. chesapeaki*

en Europe et chez les espèces de palourde *Venerupis decussata* (= *Ruditapes decussatus*) et *V. philippinarum* (= *R. philippinarum*). Suite à cette caractérisation en France (Arzul et al. 2012), *P. chesapeaki* a été détecté dans une autre espèce de bivalve fouisseur, la coque *Cerastoderma edule* dans le Delta de l'Ebre en Espagne (Carrasco et al., 2014).

Son introduction en Europe pourrait avoir eu lieu via les introductions d'espèces sensibles telles que *Mya arenaria* ou *Mercenaria mercenaria* depuis l'Amérique du Nord.

Dans notre étude, *Perkinsus olseni* et *P. chesapeaki* apparaissent sympatriques dans deux sites distincts : l'étang de Salses-Leucate et Bonne Anse en Charente Maritime. Dans le premier cas, au vu des résultats de séquençage et des observations en hybridation *in situ*, *P. olseni* semble plus abondant tandis qu'à Bonne Anse les résultats moléculaires (non confirmés par hybridation *in situ*) suggèrent que *P. chesapeaki* est prédominant. Cette différence apparente peut traduire une compétition potentielle entre espèces parasites. Cependant la distribution identique de ces espèces dans les différents organes des palourdes infectées ne conforte pas l'hypothèse de compétition interspécifique.

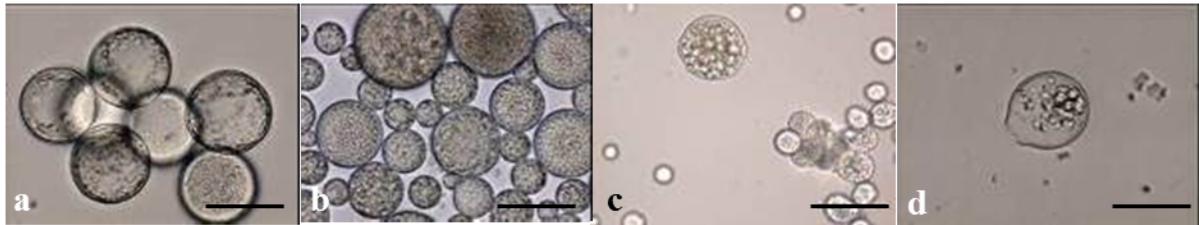


Figure 17- Trophozoïtes (a & b), schizontes (c) et zoosporanges (d) de *Perkinsus chesapeaki* détecté à Salses-Leucate (Arzul et al., 2012). Barre = 40 µm

3. Variabilité sur un même thème

La région des gènes codant les ARNs ribosomiques est une région importante pour les études phylogénétiques. Cependant, les séquences qui la composent présentent des intérêts différents en raison de leur degré variable de polymorphisme. Ainsi, les gènes codant les ARN ribosomiques présentent des marqueurs très conservés pouvant être utilisés pour des reconstructions phylogénétiques à un haut niveau taxinomique (Hershkovitz and Lewis, 1996). Au contraire, les séquences adjacentes que sont les espaceurs internes transcrits

« ITS1 » et « ITS2 » présentent des variations plus importantes et sont donc privilégiées pour des études à un niveau taxonomique plus fin (Coleman, 2003).

Comme évoqué précédemment, les deux types *Marteilia refringens* O et M ont été définis sur la base d'un dimorphisme présent au niveau d'un des sites reconnus par l'endonucléase *HhaI* dans la région ITS 1 (Le Roux et al. 2001). Ainsi, derrière le nom d'une espèce se cachent plusieurs types présentant a priori une préférence d'hôte.

Dans le cadre d'un stage de Master 2 (Gaillard, 2009) portant sur la caractérisation du parasite *Marteilia refringens* présent dans l'étang de Diana en Corse, plus de 50 échantillons provenant de différentes régions géographiques (Tableau 3) dont 16 de Diana, ont été analysés en PCR et séquençage. La majorité de ces échantillons correspondait à des moules *Mytilus galloprovincialis* (24 échantillons) et *M. edulis* (19 échantillons). Six échantillons d'huître plate *Ostrea edulis* ont été inclus dans l'étude ainsi que sept prélèvements de zooplancton provenant de Diana. Trois régions du génome ont été ciblées mais n'ont pu être séquencées systématiquement pour tous les échantillons : un fragment de 246 pb de l'ARNr 18S, un fragment de 412 pb de l'ITS1 et un fragment de 358 pb de l'espaceur intergénique (IGS). Ainsi 31 séquences ont été obtenues pour la région 18S, 54 pour la région ITS-1 dont 12 après clonage et 53 pour la région IGS.

Espèce hôte	Localité	Région du génome ciblée		
		18S	ITS1	IGS
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Corse	Type 1 (4)	M1 (12) M2 (2) O1 (3)	A1 (8)
	Thau		M1 (2)	A1 (3)
	Maroc		M1 (1)	
	Turquie	Type 1 (2)	M1 (2)	A3 (3)
	Croatie			A1 (1)
<i>Mytilus edulis</i>	Normandie	Type 1 (16) Type 2 (1)	M3 (19)	A1 (11)
	Brest	Type 1 (2) Type 2 (2)	M1 (6)	A1 (2) A2 (2)
	Royaume-Uni	Type 1 (2)	M1 (2)	A1 (5)
<i>Ostrea edulis</i>	Italie	Type 1 (2)	O2 (2)	B1 (4)
	Turquie		O2 (1)	
Zooplancton	Corse	Type 1 (1)	M1 (2) M2 (2) I (4)	A1 (2) I (3)

Tableau 3. Echantillons analysés et types de séquence obtenus pour les régions 18S, ITS-1 et IGS de *Marteilia refringens*

Deux types de séquences ont été obtenus sur la région 18S, le type 2 présentant une insertion d'un "A" par rapport au type 1. Le type 2 a été détecté uniquement sur des moules *Mytilus edulis* provenant de Normandie (1 moule) et de Brest (2 moules).

Six séquences types ont été obtenues sur la région ITS-1 (Tableau 3, Figure 18):

- M1 et O2 identiques aux types M et O définis par Le Roux et al. (2001)
- M2 (3 transitions nucléotidiques) et M3 (2 insertions) proches de M1
- O1 (2 transitions nucléotidiques) proche de O2
- I proche de *Marteilia cochillia* récemment décrit chez la coque (Carrasco et al. 2013)

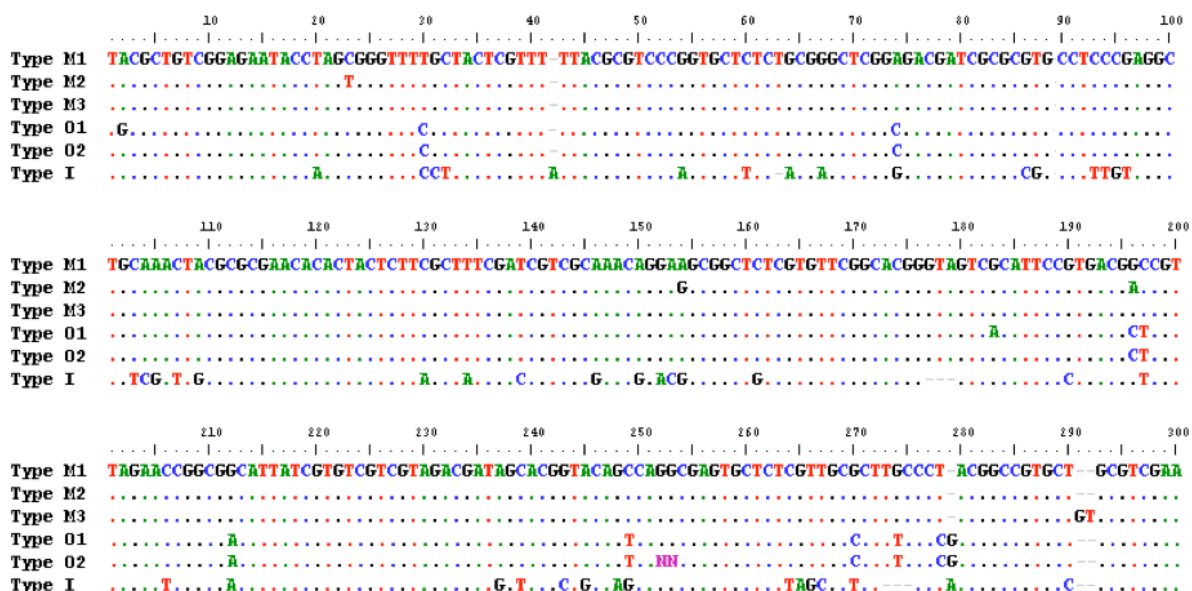


Figure 18. Alignement de la région ITS1 de *Marteilia refringens* pour les différents types de séquences identifiés dans notre étude.

Certains types n'ont été détectés que chez une espèce ou catégorie d'échantillons comme par exemple le type O2 chez *Ostrea edulis* ou le type I dans du zooplancton. D'autres types n'ont été retrouvés que dans une région géographique comme le type M3 en Normandie et le type M2 en Corse.

Enfin sur la région IGS, cinq types de séquences ont été obtenues : les types A1, A2 et A3 présentent plus de 99% d'homologie entre eux; le type B1 présente un peu moins de 97%

d'homologie avec les types A; le type I présente plus de 40% de divergence par rapport aux séquences A et B.

De même que sur la région ITS1, certains types ne sont détectés que pour une catégorie d'échantillons (type B1 pour *Ostrea edulis* et type I pour le zooplancton) et d'autres que pour certaines régions géographiques (type A3 en Turquie et type A2 à Brest).

Si certaines associations entre séquence type et espèce hôte ou localité apparaissent, les données de séquences obtenues sur un même site, l'étang de Diana, suggèrent la présence et la circulation de plusieurs types de *Marteilia refringens* entre les moules et le compartiment zooplanctonique (Arzul et al., 2013). En effet, alors que le parasite n'a pas pu être détecté dans les huîtres plates prélevées à proximité des moules sur la même période d'étude, les séquences obtenues chez les moules apparaissent distribuées dans deux groupes (Figure 19): l'un proche du type M et l'autre proche du type O tels que définis par Le Roux et al. (2001). Parfois une même moule apparaît infectée par les deux types de parasite. Par ailleurs, deux types de séquences ont été détectés dans le compartiment zooplanctonique, le type M et un type présentant 96% d'homologie avec *M. cochillia* détecté chez les coques en Espagne (Carrasco et al., 2013; Villalba et al., 2014).

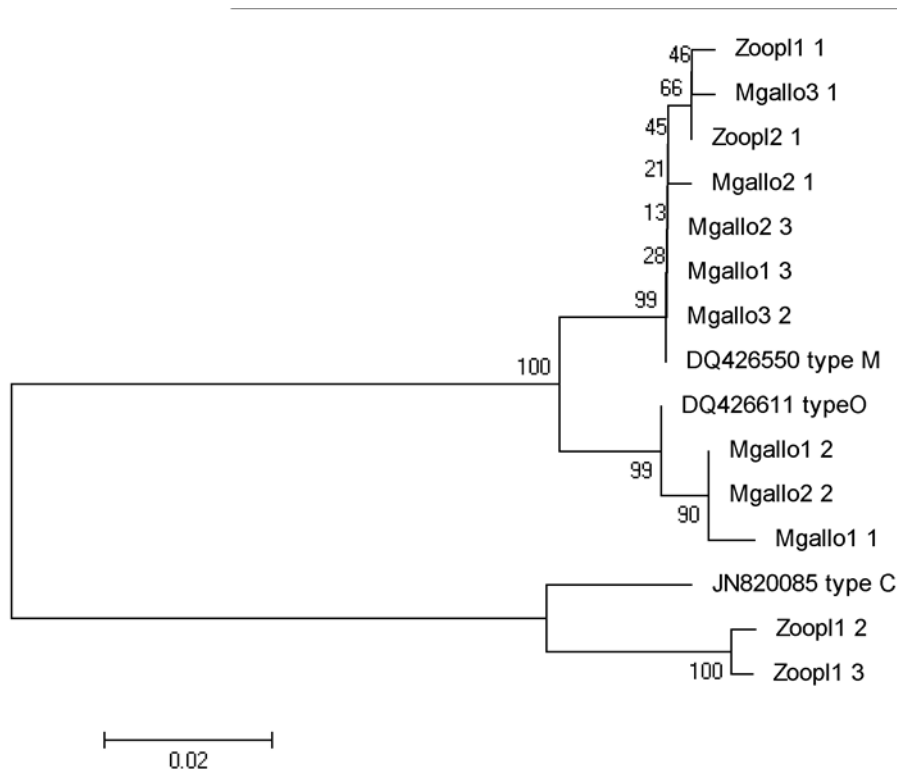


Figure 19. Analyse phylogénétique (méthode de Neighbour-joining) des séquences obtenues sur la région ITS1 de *Marteilia refringens* pour les échantillons prélevés en Corse (Etang de Diana). Trois séquences « référence » ont été incluses dans l'analyse : DQ426550 pour *M. refringens* type M, DQ426611 pour *M. refringens* type O et JN820085 pour *M. cochillia* (Arzul et al., 2013)

Les résultats obtenus mettent en évidence une diversité au sein de *Marteilia refringens* et posent des questions concernant la spécificité d'hôte et les voies de transmission suivies par ces différents types de parasites.

D. Conclusion

Alors que de plus en plus de génomes complets sont séquencés, les analyses phylogénétiques entrent dans une nouvelle ère, celle de la phylogénomie. Ces approches qui reposent sur l'analyse combinée d'un grand nombre de gènes ou des génomes complets, permettent de répondre à des questions fondamentales en termes d'évolution (Eisen and Fraser, 2003) et ont mis en évidence les limites des analyses ne portant que sur un gène, le plus souvent ribosomal (Wu and Eisen, 2008). Dans ce contexte, nous nous sommes attachés à caractériser de nouveaux gènes de *Bonamia ostreae*. Nous avons ainsi caractérisé deux

gènes d'actine et un gène codant une HSP90. Outre leur intérêt pour les analyses phylogénétiques, les résultats obtenus ont permis dans le cas des gènes d'actine le développement d'un outil diagnostique spécifique ou pour la HSP90 la réalisation d'essais expérimentaux permettant de mieux comprendre l'implication de cette protéine dans l'invasion des hémocytes. Une approche plus large de RNA seq nous ouvre aujourd'hui la porte vers la phylogénomie en collaboration avec des collègues de l'Université de Liège. Mais l'ensemble des contigs identifiés nous offre également la possibilité d'envisager des études de génomique fonctionnelle afin de mieux comprendre le développement de l'infection. Le développement d'outils diagnostiques contribue à améliorer la surveillance des maladies, à condition que ces outils aient été correctement validés avant d'être transférés aux différents acteurs concernés. Nous nous sommes ainsi impliqués dans le développement et la validation d'outils de PCR en temps réel permettant dans un cas de détecter et quantifier *B. ostreae* et dans l'autre cas de détecter et typer *Marteilia refringens*. Outre leur intérêt en terme de détection, ces deux outils offrent des perspectives afin de mieux comprendre la distribution *B. ostreae* dans son hôte voire l'environnement autour de l'hôte et afin de mieux appréhender les flux des types M et O de *M. refringens* dans ses différents hôtes.

Les trois études portant sur la diversité intra genre ou intra spécifique démontrent l'importance de l'association des outils microscopiques et moléculaires pour le diagnostic des parasites protozoaires chez les bivalves et soulignent également la difficulté de détecter une espèce non majoritaire. Les approches suivies ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs espèces ou types très proches morphologiquement. Dans nos exemples, *Bonamia exitiosa*, *Perkinsus chesapeaki* et *Marteilia* types O et I pourraient être considérées comme des espèces ou des types cryptiques dans la mesure où ils infectent les mêmes populations voire les mêmes bivalves et qu'ils apparaissent minoritaires. La cohabitation entre ces espèces ou types très proches impliquent des interactions intra genre ou intra spécifique qu'il serait intéressant de caractériser plus finement.

Par ailleurs, la détection de parasites préalablement considérés comme exotiques (*Bonamia exitiosa* et *Perkinsus chesapeaki*) interpèle quant à l'origine de ces parasites: ont ils été importés à la faveur de mouvements d'animaux à des fins d'aquaculture ou pour la consommation humaine ou leur présence est elle la conséquence d'une association avec un ancêtre de leur hôte?

III. Spécificité des parasites protozoaires chez les bivalves

La connaissance des spectres d'hôte des organismes pathogènes auxquels les mollusques marins sont confrontés est nécessaire à la mise en place de mesures de contrôle et de gestion des maladies. Ces informations sont également importantes pour comprendre les résultats des travaux portant sur les interactions hôte-parasite.

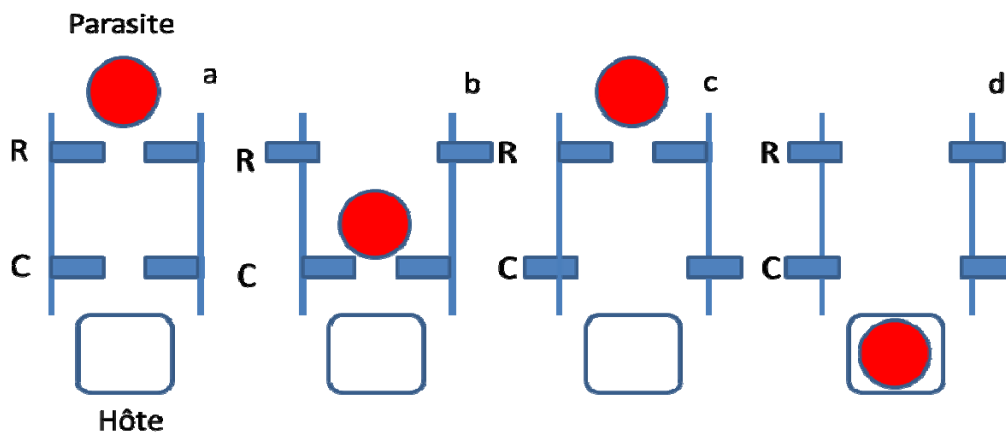
De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer la spécificité parasitaire parmi lesquelles l'hypothèse du coût et l'hypothèse du bénéfice (Combes, 2001).

L'hypothèse du coût repose sur le fait que le comportement des parasites ne peut être adapté à n'importe quelle cible. Le parasitisme implique en effet un coût en termes de détection de la cible, d'internalisation puis d'échappement aux mécanismes de défense développés par l'hôte. On comprend donc que la multiplication des espèces dans un spectre d'hôtes entraîne une augmentation considérable des coûts pour un parasite. Pourtant les parasites hétéroxènes, tels que *Marteilia refringens*, savent bien exploiter des espèces hôtes totalement différentes ; espèces bivalves et copépode dans notre exemple. Bien des parasites sont spécifiques à un moment donné du cycle et ne le sont pas d'un moment à l'autre du cycle. Cette non-spécificité présente très certainement un coût considérable pour le parasite. Ce coût doit être compensé par les bénéfices d'un tel cycle.

Dans un système hôte-parasite spécialisé, les hôtes comme les parasites doivent sans cesse s'adapter pour maintenir leur rang dans la course aux armements, la spécialisation est donc favorable à un accroissement de la diversité génétique. Mais l'augmentation de la diversité génétique parasitaire est également favorable à la conquête de nouveaux hôtes, le spectre d'hôte tend à s'élargir et la spécificité diminue. Les différences de comportement et ou de mécanismes de défenses de ces hôtes peuvent induire un isolement de population spécialisée pour chacun de ces hôtes. Ce processus a été appelé « spéciation alloxénique » par Euzet et Combes (1980). Il y aurait alors une restauration indéfinie de la spécificité et de l'avantage qu'elle procure aux parasites (Combes and Théron, 2000).

Quatre obstacles doivent être franchis pour qu'un parasite vive dans un hôte (Euzet et Combes, 1980) :

- 1- Cohabiter
 - 2- Rencontrer
 - 3- Accepter
 - 4- Se faire accepter
- } Filtre de rencontre
- } Filtre de compatibilité



Les 4 combinaisons des filtres R (Rencontre) et C (Compatibilité) (Combes, 1995)

Figure 20. Combinaisons des filtres de rencontre et de compatibilité déterminant l'existence d'un système hôte-parasite d'après Combes (1995)

Ces quatre obstacles permettent d'identifier deux filtres : filtre de rencontre et filtre de compatibilité sur lesquels s'exerce une pression de sélection de la part de l'hôte et du parasite. L'ouverture et la fermeture de ces deux filtres déterminent l'existence (Figure 20d) ou non (Figure 20 a, b et c) du système hôte-parasite et nous permettent de définir le spectre d'hôte et donc la spécificité des parasites étudiés.

Nos travaux de caractérisation de parasites au sein de nouvelles espèces et certaines études expérimentales réalisées au laboratoire contribuent à mieux définir les spectres d'hôte des parasites protozoaires et sont présentés dans cette section.

A. *Nouvelles espèces hôtes, nouvelles régions géographiques*

Dans le cadre des activités du LRUE et de collaborations internationales, nous sommes amenés à caractériser des parasites protozoaires dans de nouvelles espèces hôtes ou dans de nouvelles régions géographiques contribuant ainsi à affiner les cartes de distribution et nos connaissances sur le spectre d'hôtes de ces organismes pathogènes.

Nous avons précédemment évoqué les résultats obtenus concernant la caractérisation des parasites du genre *Perkinsus* en France. Ces travaux nous ont permis de détecter pour la première fois *Perkinsus chesapeaki* en Europe et sur deux espèces de palourdes, *Venerupis decussata* (= *Ruditapes decussatus*) et *V. philippinarum* (*R. philippinarum*). L'élargissement apparent de l'aire de distribution de ce parasite pourrait avoir résulté de transferts d'espèces sensibles telles que *Mercenaria mercenaria* ou *Macoma balthica* depuis des régions infectées (Baie de Chesapeake, U.S.A.) vers les côtes françaises.

Un certain nombre de parasites du genre *Bonamia* non complètement caractérisés semblent s'apparenter à *Bonamia exitiosa* tel que *Bonamia* sp. détecté sur des huîtres *Ostrea chilensis* au Chili (Figure 16; Arzul et al., 2005). Nous avons notamment contribué à la caractérisation moléculaire de certaines régions du génome du parasite détecté chez *O. angasi* en Australie ou chez *O. edulis* en Europe, ce qui nous a permis de conclure qu'il s'agissait également de l'espèce *B. exitiosa* (Arzul et al., 2011; Corbeil et al., 2006b; Narcisi et al., 2010). Les résultats de nos travaux associés à ceux publiés par Hill et al. (2010) et Carnegie et al. (2013) mettent en évidence une large distribution géographique et un large spectre d'hôte de *B. exitiosa* laissant suspecter une évolution entre ce parasite et les bivalves antérieure à l'apparition des genres *Ostrea* et *Crassostrea*.

L'utilisation d'outils moléculaires nous a également permis de revisiter la liste des espèces sensibles à *Marteilia refringens*. De nombreuses descriptions avaient effectivement rapporté la présence de parasites morphologiquement similaires à *M. refringens* dans différentes espèces de bivalves à travers le monde. Dans certains cas, de nouvelles espèces étaient proposées sur la base de différences morphologiques ou ultrastructurales comme

par exemple *M. lengehi* chez *Saccostrea cucullata* (Comps, 1976) ou *M. christenseni* chez *Scropicularia piperata* (Comps, 1985). L'identité exacte de ces parasites n'a jamais pu être déterminée. Cependant, les descriptions plus récentes reposent plus systématiquement sur des observations en microscopie et sur des données moléculaires. Dans le cadre d'une coopération avec la faculté vétérinaire de Ljubjana en Slovénie, il a été possible de démontrer que *M. refringens* type M infectait des moules *Mytilus galloprovincialis* dans une population de moules cultivées mais aussi dans une population de moules sauvages (Gombač et al., 2013). Ces résultats complètent ainsi les données disponibles concernant la présence du parasite en Adriatique.

Par ailleurs, dans le cadre de l'accueil de la doctorante Refka Elgharsalli au laboratoire, nous nous sommes intéressés aux huîtres provençales *Ostrea stentina* présentant de fortes mortalités ces dernières années. Le parasite *Bonamia exitiosa* avait été précédemment mis en évidence mais avec de faibles fréquences de détection suggérant qu'un autre facteur pouvait expliquer les mortalités observées. Le parasite *Marteilia refringens* a pu être détecté dans plus de 80% des huîtres analysées. Des observations en microscopie électronique à transmission ainsi que le séquençage de fragments de la région 18S et ITS-1 du parasite nous ont permis de démontrer que les huîtres *O. stentina* présentes en Tunisie étaient infectées par le parasite *M. refringens* type O (Elgharsalli et al., 2013). Considérant la forte prévalence du parasite et les niveaux importants d'infection relevés en histologie, *M. refringens* contribue très probablement aux mortalités rapportées dans cette étude.

Ainsi, l'association de plusieurs outils microscopiques et moléculaires nous permet aujourd'hui de préciser les spectres d'hôtes des parasites protozoaires que nous étudions. La liste des espèces sensibles tend à s'allonger au fur et à mesure de l'étude de nouvelles espèces de bivalves dans de nouvelles régions du monde.

B. Une approche bibliographique

La mise en place de mesures de surveillance et de contrôle des maladies nécessite de bien définir l'organisme pathogène en cause, ce que nous avons vu dans la partie II, mais également de connaître au mieux son spectre d'hôtes. Dans le cadre d'un groupe de travail pour l'EFSA (European Food Safety Authority) nous avons été amenés à établir les listes d'espèces sensibles aux maladies des animaux aquatiques à déclaration obligatoire.

Dans un premier temps, nous avons défini les critères qui nous permettaient de considérer une espèce comme sensible à chaque maladie réglementée. Les évidences scientifiques ont été considérées différemment selon qu'elles reposaient sur des cas d'infections naturelles ou sur des données expérimentales. En effet, la nature invasive (e.g. injection) ou non invasive (e. g. cohabitation) de l'infection expérimentale peut mimer plus ou moins bien les conditions naturelles et ainsi fausser la réalité de la sensibilité d'une espèce à un organisme pathogène.

Les quatre critères suivants ont été retenus pour analyser les données disponibles dans la littérature afin d'évaluer la sensibilité des espèces potentiellement hôtes aux organismes pathogènes :

- A- Réplication de l'organisme pathogène dans l'hôte
- B- Viabilité de l'organisme pathogène dans l'hôte
- C- Changements clinico-pathologiques associés à l'organisme pathogène
- D- Localisation tissulaire de l'organisme pathogène dans l'hôte

L'évaluation de ces critères nous a notamment permis de proposer une liste d'espèces hôtes pour lesquelles la qualité des données publiées disponibles démontre la susceptibilité à un organisme pathogène donné et une liste d'espèces pour lesquelles les données disponibles étaient incomplètes. Ces données et ces analyses ont fait l'objet d'un rapport (http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902178477.htm) utilisé par la Commission européenne pour établir la liste des espèces sensibles aux maladies à

déclaration obligatoire. Des restrictions de transfert sont donc susceptibles d'être appliquées pour ces espèces hôtes depuis des zones infectées vers des zones non infectées.

Si nous prenons l'exemple de *Marteilia refringens*, la liste réactualisée des espèces bivalves pouvant être considérées comme sensibles à ce parasite compte aujourd'hui des représentants des genres *Ostrea*, *Mytilus*, *Xenostrobus*, *Chamelea* et *Solen* (espèces en bleu dans le Tableau 4). Les données disponibles indiquent que d'autres espèces sont également susceptibles d'être sensibles au parasite mais tous les critères ne sont pas atteints et/ou l'identification moléculaire du parasite n'est pas disponible (espèces en noir dans le Tableau 4).

Cette analyse nous démontre que *Marteilia refringens* présente un spectre d'hôte large incluant des espèces de bivalve appartenant à des lignées très différentes comme *Venerupis philippinarum* ou *Chamelea gallina* qui appartiennent aux Heterodonta et *Ostrea edulis* ou *Mytilus* spp. qui appartiennent aux Pteriomorphia. Cette apparente faible spécificité présente très certainement un coût mais peut être une stratégie pour se maintenir au sein de l'écosystème. Nous avons vu dans la partie II Diversité que plusieurs types de *M. refringens* pouvaient co exister au sein d'une même population d'hôtes voire d'un même hôte mais aussi que certains types pourraient être associés à une espèce hôte ou un lieu géographique.

Famille/Genre	Espèce	Références
Ostreidae/Ostrea	<i>Ostrea edulis</i>	(Grizel et al., 1974; Le Roux et al., 2001)
	<i>Ostrea angasi</i>	(Bougrier et al., 1986)
	<i>Ostrea puelchana</i>	(Pascual et al., 1991)
	<i>Ostrea chilensis</i>	(Grizel et al., 1983)
	<i>Ostrea stentina</i>	(Elgharsalli et al., 2013)
Ostreidae/Crassostrea	<i>Crassostrea gigas</i>	(Cahour, 1979; Montes et al., 1998; Riera et al., 1993)
	<i>Crassostrea virginica</i>	(Renault et al., 1995a)
Ostreidae/Saccostrea	<i>Saccostrea cucullata</i>	(Comps, 1976)
Mytilidae/Mytilus et Xenostrobus (=Modiola)	<i>Mytilus edulis</i>	(Comps et al., 1975; Le Roux et al., 2001; Poder et al., 1983)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	(Camacho et al., 1997; Comps et al., 1982; Le Roux et al., 2001; Villalba et al., 1993c; Zrncic et al., 2001)
	<i>Xenostrobus securis</i>	(Pascual et al., 2010)
Cardiidae/Ceastoderma	<i>Ceastoderma edule</i>	(Comps et al., 1975; Poder et al., 1983)
Veneridae/Venerupis (= Ruditapes), Polititapes (= Tapes), Chamelea	<i>Venerupis decussata</i>	(Villalba et al., 1993a)
	<i>Venerupis philippinarum</i>	(Itoh et al., 2005)
	<i>Polititapes rhomboides</i>	(Poder et al., 1983; Villalba et al., 1993a)
	<i>Venerupis corrugata</i> (= <i>Tapes pullastra</i>)	(Poder et al., 1983; Villalba et al., 1993a)
	<i>Chamelea gallina</i>	(Lopez-Flores et al., 2008b)
Semelidae/Scrobicularia	<i>Scrobicularia plana</i> (= <i>S. piperata</i>)	(Comps, 1985)
Pharidae/Ensis	<i>Ensis minor</i>	(Ceschia et al., 2001)
Solenidae/Solen	<i>Solen marginatus</i>	(Lopez and Darriba, 2006; Lopez-Flores et al., 2008a)

Tableau 4. Liste des espèces bivalves potentiellement sensibles à *Marteilia refringens*. En bleu : espèces pour lesquelles nous avons suffisamment d'arguments pour conclure quant à leur sensibilité vis-à-vis de *Marteilia refringens*. En noir : espèces pour lesquelles certains critères ou l'identification moléculaire manquent pour pouvoir conclure quant à leur sensibilité vis-à-vis de *Marteilia refringens*.

C. Des approches expérimentales

L'huître plate *Ostrea edulis* est à ce jour le seul hôte naturel connu de *Bonamia ostreae*. D'autres espèces d'huître (*O. puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis* (= *Tiostrea chilensis*, *T. lutaria*) ont été détectées infectées en histo ou cytologie après avoir été immergées dans des zones où le parasite est endémique (Carnegie and Cochenec-Laureau, 2004). Cependant, ces observations n'ayant pas été complétées par des analyses moléculaires, il n'est pas possible de conclure quant à l'identité du parasite détecté. Des essais expérimentaux ont également montré que l'huître creuse asiatique *Crassostrea ariakensis* est sensible au parasite *B. ostreae* (Audemard et al., 2005). Enfin, il a été spéculé que l'huître plate du Pacifique *O. conchaphila* (= *O. lurida*) pouvait être infectée par *B. ostreae* mais cette hypothèse n'a jamais été confirmée (Carnegie and Cochenec-Laureau, 2004).

L'aire de répartition de *Bonamia ostreae* couvre une partie de l'Europe (Norvège, Royaume Uni, Irlande, Pays Bas, France, Espagne et Italie) et de l'Amérique du Nord (Etats Unis : Californie, Maine et Washington et Canada : Colombie Britannique). Parmi les espèces d'huîtres potentiellement sensibles à ce parasite, seule *Ostrea conchaphila* (= *O. lurida*) se trouve dans l'aire de répartition de *B. ostreae* et pourrait ainsi passer le filtre de rencontre.

Par ailleurs, l'apparition des mortalités d'huîtres plates associées au parasite *Bonamia ostreae* en France et en Espagne aurait succédé à l'importation de naissain infecté provenant des Etats Unis (Elston, 1990). Or *Ostrea edulis* n'est pas native d'Amérique du Nord et a été importée d'Europe dans les années 1940 et 1950. Elle aurait alors pu y côtoyer des animaux infectés à *B. ostreae*, comme par exemple *O. conchaphila*. Plusieurs descriptions histologiques ou ultrastructurales rapportent la présence de « microcells » dans cette espèce (Farley et al., 1988 ; Friedman et al., 2005). Ces « microcells » auraient pu correspondre à *B. ostreae*. Cependant aucune donnée moléculaire n'a pu confirmer l'espèce du protozoaire observé chez *O. conchaphila*, ne permettant donc pas de conforter l'hypothèse de départ (Elston, 1990).

Disposant d'huîtres plates du Pacifique au laboratoire, nous avons pu tester la sensibilité de cette espèce vis-à-vis de *Bonamia ostreae*.

Deux approches ont été suivies : la première reposait sur une expérience de cohabitation entre des huîtres *Ostrea conchaphila* et des huîtres *O. edulis* infectées (Arzul et al., 2005) et la

deuxième approche consistait à mettre en contact des hémocytes de ces espèces avec des parasites purifiés.

1. Essai d'infection par cohabitation

Dans le cadre de l'expérience de cohabitation, des huîtres *Ostrea conchaphila* ont été maintenues pendant 11 mois en contact avec des huîtres *O. edulis* provenant d'un site infecté à *Bonamia ostreae* (Quiberon, Morbihan). En parallèle, des huîtres *O. edulis* provenant d'une zone non infectée (Veules les Roses, Seine-Maritime) ont été maintenues dans les mêmes conditions en présence d'huîtres *O. edulis* prélevées à Quiberon.

Les huîtres mortes ont été relevées quotidiennement et ont fait l'objet d'analyse par apposition de tissus cardiaques afin de tester la présence du parasite *Bonamia ostreae*. Le reste des tissus a été congelé pour la réalisation éventuelle d'analyses en biologie moléculaire. L'ensemble des huîtres survivantes à la fin des 11 mois a été sacrifié et a été analysé de la même façon que les huîtres mortes lors du suivi.

Au terme de l'expérience, les huîtres plates du Pacifique ont présenté moins de 5% de mortalités alors que 76% des huîtres *Ostrea edulis* testées sont mortes. Le parasite a été détecté dans 64% des huîtres *O. edulis* testés tandis qu'aucune huître *O. conchaphila* n'est apparue infectée.

Les huîtres *Ostrea conchaphila* testées ont fait l'objet d'analyse complémentaire en PCR, outil considéré comme plus sensible que l'histologie pour la détection de *Bonamia ostreae*. L'ensemble des résultats était négatif.

Ainsi dans nos conditions expérimentales, les huîtres plates du Pacifique testées manifestent une résistance vis-à-vis de *Bonamia ostreae*, ces résultats suggèrent qu'*Ostrea conchaphila* n'est pas un hôte pour ce parasite. Le filtre de compatibilité semble donc fermé.

2. Essai d'infection *in vitro*

Cette étude a été complétée par une approche *in vitro* consistant à mettre en contact des hémocytes avec des parasites purifiés (Miahle et al., 1988) à raison de 5 parasites pour un hémocyte. Trois espèces d'huîtres ont été testées dans ces conditions : *Ostrea edulis*, *O. conchaphila* et *Crassostrea gigas*. En effet, *O. edulis* est connue pour être sensible au parasite

tandis que des études expérimentales par injection de parasites *Bonamia ostreae* avaient montré que l'huître creuse *C. gigas* n'est pas sensible à la bonamiose (Culloty et al., 1999; Renault et al., 1995b).

Dans notre approche, deux expériences ont été réalisées, l'une à 15°C et l'autre à 20°C. Les hémocytes ont été prélevés après 1h, 2 h et 4 h de contact et cytocentrifugés avant d'être observés au microscope photonique ou culotés et traités pour être observés en microscopie électronique à transmission. Pour chaque condition testée, nous avons établi le pourcentage d'hémocytes ayant internalisé au moins un parasite (appelés abusivement hémocytes « infectés » dans la suite du paragraphe) et le nombre moyen de parasite par hémocyte « infecté » (Figure 21). Quelle que soit l'espèce considérée il a été possible d'observer des hémocytes ayant internalisé le parasite. Bien que nous n'ayons pas distingué les différents types d'hémocytes dans cette étude, il nous a été possible d'observer des parasites dans des cellules granuleuses et agranuleuses des trois espèces d'huître testées.

De façon générale, l'espèce d'huître ($P=8.74e-08$) et le temps d'incubation ($P=0.02$) ont un effet significatif sur le pourcentage d'hémocytes « infectés ». On observe significativement moins d'hémocytes « infectés » chez *Ostrea edulis* que chez *O. conchaphila* ($P= <0.001$). L'évolution des pourcentages de ces hémocytes semble différente entre les deux conditions de température testées : on observe une augmentation de la proportion d'hémocytes « infectés » à 15°C alors que celle-ci reste stable à 20°C. Le nombre moyen de parasites par hémocyte « infecté » semble évoluer de la même façon que le pourcentage de « cellules infectées » et apparaît significativement plus élevé chez *O. conchaphila* que chez *O. edulis* ($Pr= 0.04$).

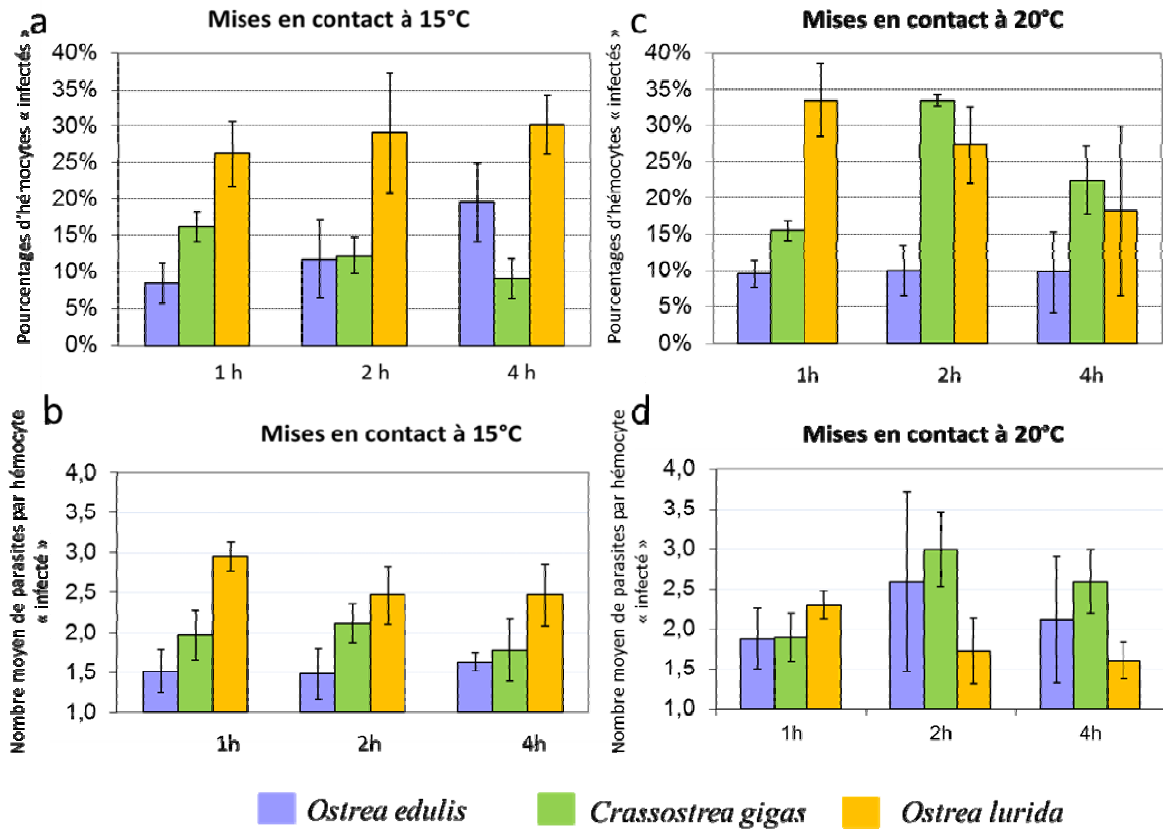


Figure 21. a et c : Pourcentages d'hémocytes ayant internalisé au moins un parasite (=«Hémocytes infectés»). b et d : Nombre moyen de parasite par « hémocyte infecté »

Nous avons alors évalué la proportion de parasites intra-hémocytaires ayant deux noyaux. Quels que soient le temps d'incubation et l'espèce d'huître, il est possible d'observer des cellules parasitaires binucléées. L'observation de telles cellules après 2h et 4h suggère que le parasite se multiplie dans les hémocytes des trois espèces d'huître mais apparemment de façon plus pérenne chez *Ostrea edulis*. On note en effet que le nombre de *Bonamia ostreae* binucléées est plus important chez *O. edulis* après 4h d'incubation que chez les autres espèces.

Les espèces considérées comme résistantes (i.e. *Crassostrea gigas* et *Ostrea concaphila*) à la bonamiose semblent avoir une capacité de phagocytose de *B. ostreae* supérieure à *O. edulis*. Le nombre de parasites moyen par hémocyte est inférieur chez *O. edulis* aux autres espèces, cette différence est significative à 15°C en particulier entre les deux espèces d'huîtres plates. Le nombre plus important de parasites internalisés chez *C. gigas* et *O. concaphila* peut résulter d'une multiplication intra hémocytaire du parasite mais surtout d'une

internalisation plus importante du parasite dans les hémocytes, ceci dès 1h de mise en contact à 15°C.

Les observations ultrastructurales de ces différentes mises en contact ont permis d'observer des images communes d'endocytose des parasites, avec la formation de pseudopodes par les hémocytes, venant entourer les particules parasitaires (Figure 22, a, b, c). On observe à plus fort grossissement des contacts entre les membranes hémocytaires et parasitaires. Les parasites se trouvent alors inclus dans une vacuole. Enfin, la forme des parasites une fois internalisés évolue avec le temps. On observe en effet d'avantage de parasites altérés à 4 heures qu'à 1 ou 2 heures d'incubation. De plus, nous avons pu observer d'avantage de formes dégradées du parasite dans les huîtres creuses et les huîtres plates du Pacifique que dans l'espèce européenne (Figure 22). Dans les cas où le parasite semble dégradé, la forme circulaire s'altère et devient moins nette. Nos résultats sont concordants avec les résultats de Chagot et al. (1992) qui avaient également montré que *Bonamia ostreae* était internalisé dans les hémocytes de *Crassostrea gigas* mais présentait d'avantage de dégradation que dans les hémocytes d'huître plate *Ostrea edulis*. Dans une étude complémentaire de Mourton et al. (1992), les pourcentages d'hémocytes infectés n'étaient pas significativement différents entre *O. edulis* et *C. gigas*, résultats que nous observons également dans notre étude.

Ainsi l'ensemble des données disponibles concernant *Ostrea conchaphila*, tend à indiquer qu'elle n'est pas sensible à *Bonamia ostreae*.

Les huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea conchaphila* peuvent naturellement ou à des fins d'élevage cohabiter avec des huîtres plates *O. edulis* infectées par *Bonamia ostreae*. Si dans cette situation le filtre de rencontre est ouvert, le filtre de compatibilité semble quant à lui fermé. Les mécanismes impliqués dans cette « incompatibilité » mériteraient d'être étudiés plus précisément d'autant plus qu'au niveau cellulaire des différences sont observées entre ces espèces et *O. edulis*.

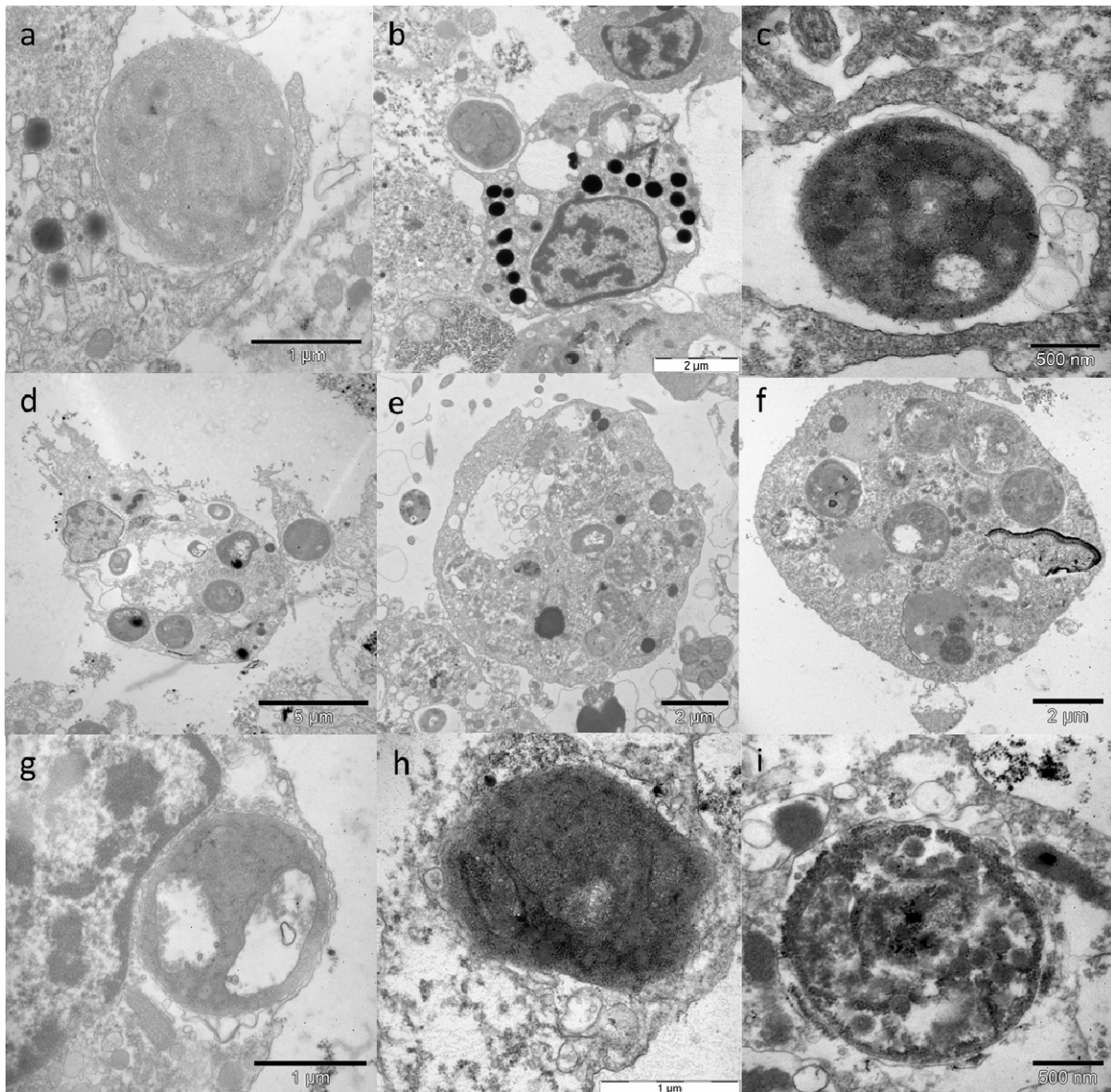


Figure 22. Hémocytes d'huître *Ostrea edulis* (a, d, g) *Crassostrea gigas* (b, e, h) et *Ostrea concaphila* (c, f, i) mis en contact avec *Bonamia ostreae*. Formation de pseudopodes entourant le parasite avant internalisation (a, b, c). Hémocytes ayant internalisé plusieurs parasites (d, e, f). Parasites après 4h de contact avec les hémocytes (g, h, i)

D. Conclusion

Nous avons vu que l'association d'outils microscopiques et moléculaires nous permet de compléter et de préciser les spectres d'hôtes et la distribution géographique des parasites protozoaires que nous étudions. Ainsi *Marteilia refringens* apparaît comme un parasite généraliste, tandis que *Bonamia ostreae* est l'exemple même d'un parasite spécifique. Mais la spécificité d'un parasite pour son hôte n'est pas figée, elle est susceptible d'évoluer dans le

temps et dans l'espace en fonction des transferts de coquillages réalisés par l'homme et de l'évolution du parasite dans ses hôtes.

L'approche expérimentale permet de tester la sensibilité d'une espèce vis-à-vis d'un parasite et permet également d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le filtre de compatibilité déterminant l'existence du système hôte-parasite. Les travaux expérimentaux réalisés sur l'huître plate du Pacifique, *Ostrea concaphila*, nous montre que contrairement aux hypothèses préalables, cette espèce n'est pas sensible à *Bonamia ostreae*.

De plus, les études complémentaires réalisées à l'échelle de l'hémocyte nous révèlent que quelle que soit l'espèce d'huître testée, le parasite est internalisé dès 1h de mise en contact avec des hémocytes. *Ostrea edulis* présente généralement moins d'hémocytes ayant internalisé le parasite et les observations ultrastructurales révèlent moins de formes parasitaires dégradées que les autres espèces d'huître testées. Ces résultats suggèrent donc qu'*O. concaphila* et *Crassostrea gigas* ont une capacité de phagocytose de *Bonamia ostreae* plus importante qu'*O. edulis* et qu'elles ont un système de dégradation du parasite plus efficace ou moins sensible au parasite. L'analyse phylogénétique des huîtres des genres *Ostrea*, *Saccostrea* et *Crassostrea* montre que *Ostrea* (= *Ostreola*) *concaphila* groupe avec les espèces *Ostrea* (Danic-Tchaleu et al., 2011). Cependant d'autres espèces du même genre apparaissent plus proches d'*O. edulis* telles que *O. angasi* et *O. chilensis*, deux espèces également infectées par *B. exitiosa*. De ce fait, il serait intéressant de pouvoir tester la sensibilité de ces espèces d'huître vis-à-vis de *Bonamia ostreae* et la spécificité de la réponse de l'hôte aux parasites du genre *Bonamia*.

Nous avons également montré que la température peut influencer la capacité des huîtres, en particulier de *Crassostrea gigas* à internaliser le parasite démontrant ainsi que les interactions hôte-parasite sont dépendantes des facteurs environnementaux.

IV. Transmission des parasites protozoaires des bivalves

Les parasites sont confrontés au caractère mortel et fragmenté du milieu représenté par l'hôte. Ils n'ont donc d'autres solutions que de se disperser hors de leur hôte puis de retrouver des hôtes semblables. Cette succession de séquences dans le temps et dans l'espace constitue les cycles parasitaires.

Les parasites font appel à plusieurs modes de transmission pour passer d'hôte en hôte :

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

Les cycles sont également définis en fonction du nombre et de la nature des hôtes impliqués. On parle par exemple de cycle hétéroxène lorsque le cycle fait intervenir plusieurs hôtes successifs et de cycle monoxène lorsque le cycle se déroule dans un seul hôte.

Dans certains systèmes hôte-parasite, les parasites s'échappent de leur hôte par leurs propres moyens comme les cercaires ou par les activités de l'hôte comme les trypanosomes lorsqu'ils sont éjectés au cours du repas du vecteur. Dans ces exemples, le transfert du parasite à l'hôte suivant n'implique pas nécessairement la mort de l'hôte ou du vecteur. La sortie continue de parasites en dehors de l'hôte est possible.

Dans d'autres systèmes hôte-parasite, le transfert du parasite à l'hôte suivant se fait par l'ingestion de l'hôte infecté. Ce mode de transmission est caractéristique de nombreux systèmes hôte intermédiaire-parasite et semble moins favorable au parasite puisque la seule solution de sortie s'accompagne par la mort de l'hôte. Puisque l'ingestion de l'hôte intermédiaire est la seule issue possible pour le parasite, celui-ci peut rendre son hôte plus sensible à la prédation (Barber et al., 2000).

Dans les milieux aquatiques, les phases libres des parasites vont infecter de nouveaux hôtes activement en nageant et pénétrant dans le nouvel hôte ou passivement en se faisant ingérer par celui-ci. Le milieu marin est très diffus, ce qui pose en théorie quelques difficultés aux parasites en termes de transmission. Les phases libres des parasites ont en général une courte durée de vie et doivent rapidement trouver un hôte. De nombreux parasites utilisent des organismes à courte durée de vie tels que les copépodes comme premier hôte intermédiaire (Marcogliese, 2005). Ces animaux sont très largement représentés dans les océans mais leur taux de parasitisme est souvent faible, souvent inférieur à 1/1000 (Marcogliese, 1995). Aussi, la probabilité de transmission à un prochain hôte est mince, et, souvent en milieu marin, les parasites ont recours à la phorésie ou à des hôtes paraténiques (Marcogliese, 2002, 1995; Williams, 2002). Ces hôtes ne sont pas nécessaires pour le développement du parasite mais permettent de combler des brèches temporelles ou trophiques entre hôtes intermédiaires et hôtes définitifs. Ces hôtes permettent donc aux parasites de persister plus longtemps dans l'environnement marin et augmentent la probabilité d'ingestion et donc de passage à l'hôte suivant dans le cycle.

Malgré plusieurs décennies de recherche sur les cycles de vie des parasites *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* de nombreuses questions restent posées. Au cours des cinq dernières années, nous avons plus particulièrement développé des études sur la distribution *B. ostreae* dans son hôte *Ostrea edulis*, sur la survie de ce parasite dans l'eau de mer et sur les dynamiques parasitaires de *M. refringens* chez la moule et dans le compartiment zooplanctonique.

A. - Etude du cycle de *Bonamia ostreae*

1. -Distribution dans l'hôte *Ostrea edulis*.

La transmission directe du parasite *Bonamia ostreae* entre huîtres infectées et non infectées est possible, le parasite étant surtout détecté dans les hémocytes (Comps et al., 1980; Pichot et al., 1979). Il est également rapporté en position extracellulaire entre les cellules épithéliales ou interstitielles dans les branchies et la glande digestive ou dans les zones nécrotiques des tissus conjonctifs (Montes et al., 1994). Des observations en microscopie

électronique ont également révélé la présence de parasite dans les cellules épithéliales des branchies, voire même des images de multiplication cellulaire dans ces mêmes cellules (Montes et al., 1994). Enfin, Van Banning (1990) a également rapporté la présence de *B. ostreae* dans les tissus ovariens d'huître plate suggérant une période d'incubation du parasite dans cet organe avant une phase systémique au cours de laquelle le parasite se trouve en position intra-hémocytaire.

Malgré ces différentes observations et hypothèses, les voies d'entrée et de sortie du parasite de son hôte restaient indéterminées. Nous avons donc souhaité utiliser l'hybridation *in situ* (Cochennec et al., 2000) afin de décrire la distribution du parasite dans le contexte d'une expérience d'infection par cohabitation. Nous avons acclimaté pendant 7 semaines des huîtres de deux ans provenant d'une zone non infectée en Norvège. Puis, nous les avons mises en contact avec des huîtres de 2-3 ans provenant d'une zone présentant alors 13,6% de prévalence à *Bonamia ostreae* (Quiberon) et que nous avons pour certaines d'entre elles injectées avec 10^6 parasites dans le muscle.

Entre 20 et 40 huîtres norvégiennes ont ensuite été prélevées toutes les deux semaines pendant sept mois, l'objectif étant de maximiser nos chances d'obtenir des animaux aux différents stades de l'infection.

La Figure 23 présente l'évolution des fréquences de détection de *Bonamia ostreae* ainsi que les niveaux d'infection déterminée après lecture des sections de tissus traitées en hybridation *in situ*: 1+ : infection faible, localisée à un ou deux organes, 2+ : infection modérée, nombreuses cellules parasitaires observées dans quelques organes ou quelques parasites observés dans de nombreux organes, 3+ : infection élevée, nombreux parasites dans de nombreux organes.

Ainsi 408 huîtres ont été analysées par hybridation *in situ* dans le contexte de cette étude. Une huître a été détectée infectée dès 3 semaines après le début de l'expérience, cependant il faut attendre deux mois pour observer des premiers stades d'infection modérée et élevée. La majeure partie des huîtres détectées infectées présentait un niveau d'infection faible (63%).

% d'huîtres détectées infectées

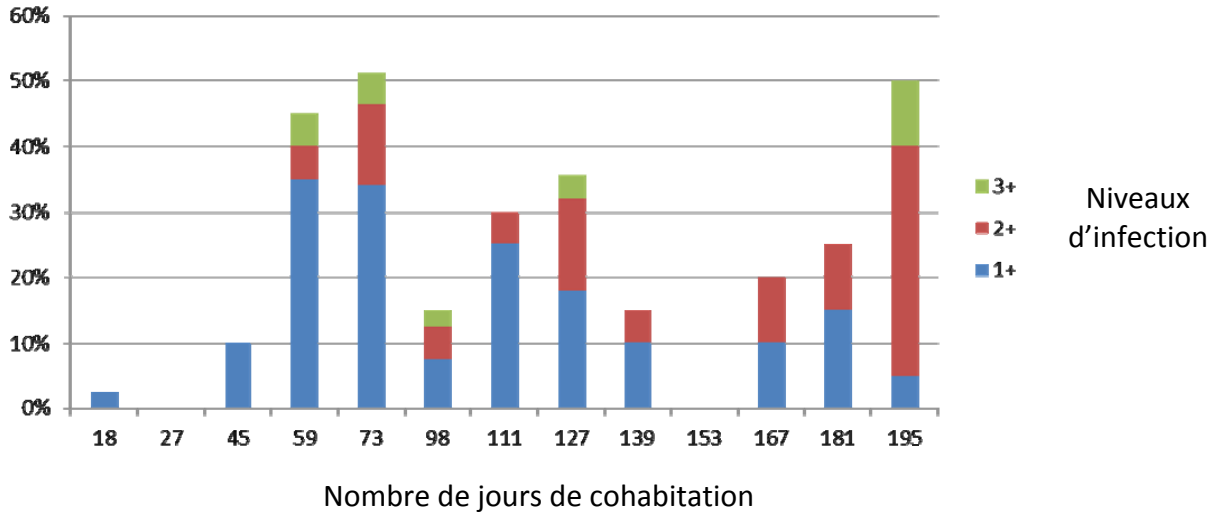


Figure 23. Pourcentages d'huîtres détectées infectées en hybridation *in situ* au cours de l'expérience d'infection par cohabitation. Les niveaux d'infection (1+, 2+ et 3+) sont indiqués par un code couleur.

Nous avons comparé pour ces huîtres infectées la fréquence de présence du parasite par organe (Figure 24). Les branchies apparaissent le plus souvent infectées (77%) puis le manteau et la glande digestive (34 et 37%). Enfin, 9% des huîtres infectées présentaient un marquage au niveau de la gonade. Le parasite a pu être observé dans d'autres organes comme le cœur, le rein, les palpes labiaux, mais ceux-ci n'étaient pas systématiquement représentés sur les sections histologiques.

Dans les cas de faible infection (Figure 25), la branchie est l'organe qui apparaît le plus souvent infecté. Néanmoins, il a été possible d'observer le parasite dans les quatre organes étudiés dans les tissus conjonctifs mais également dans les épithéliums digestifs, branchiaux et du manteau (Figure 25). La nature intra ou extracellulaire et le type cellulaire alors infecté est difficile à déterminer en hybridation *in situ*.

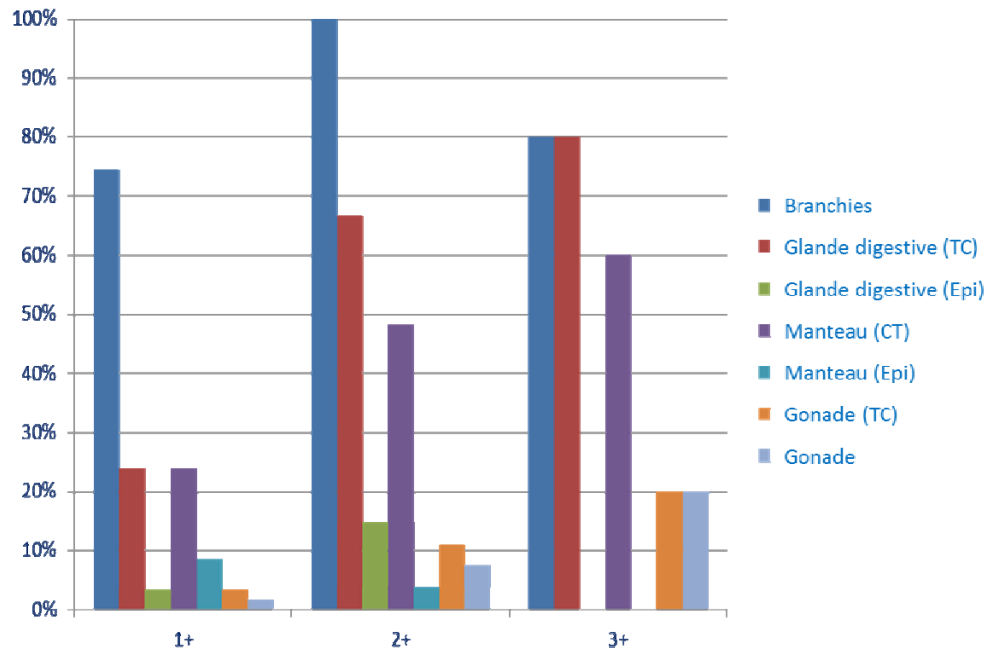


Figure 24. Pourcentages de détection par organe en fonction des niveaux d'infection détectés dans les huîtres plates dans le contexte de l'expérience d'infection par cohabitation. TC= Tissue conjonctif et Epi= épithélium.

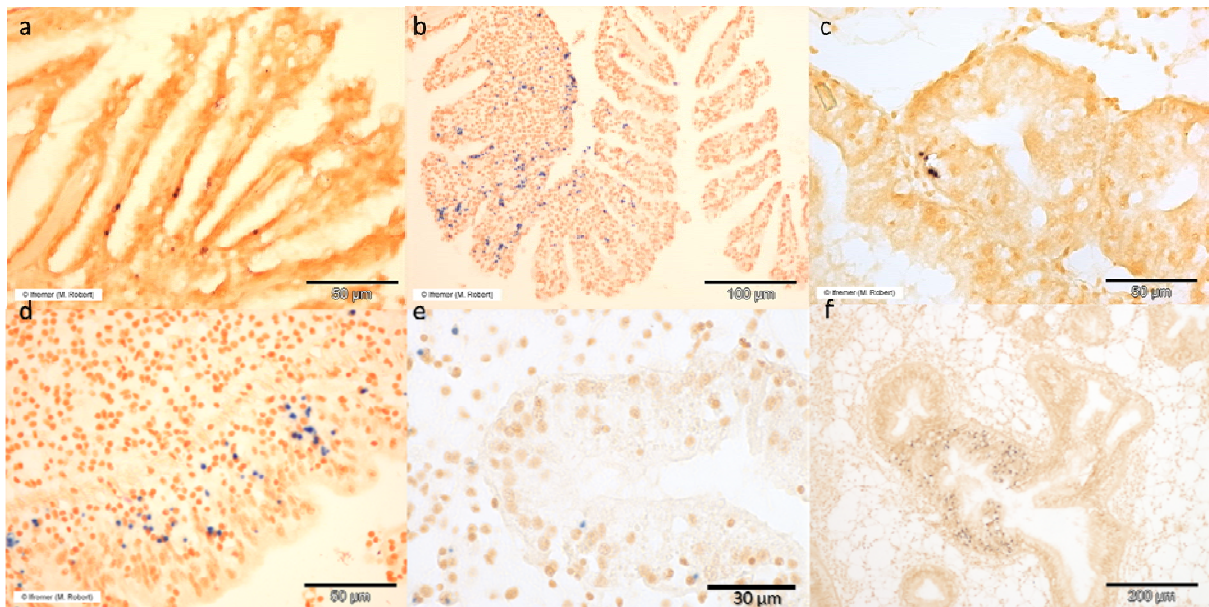


Figure 25. Analyses en hybridation *in situ* d'huîtres plates *Ostrea edulis* présentant de faibles niveaux d'infection dans le contexte d'une expérience d'infection par cohabitation. Les marquages brun ou bleu correspondent à la détection spécifique du parasite (contre-coloration= jaune de Bismark). a et b= branchies, c, e et f = épithéliums du système digestif, d= épithélium du manteau

Dans les cas d'infection modérée et élevée, la branchie mais également la glande digestive et le manteau apparaissent majoritairement infectés. La fréquence de détection du parasite dans la gonade semble augmenter conjointement à l'augmentation du niveau d'infection (Figure 24). Le parasite a pu être observé dans le tissu conjonctif autour de la gonade mais également dans des hémocytes et dans des cellules de type endothéliales entourant les gamètes. Dans les cas de forte infection, de nombreux parasites sont localisés dans les tissus conjonctifs mais également au niveau des épithéliums branchiaux et du manteau avec des images suggérant une sortie des parasites. Les tissus conjonctifs autour de la glande digestive apparaissent dans certains cas fortement infectés mais il ne nous a pas été possible de détecter de façon associée le parasite au niveau de l'épithélium digestif.

De façon complémentaire, une étude a été réalisée sur des huîtres provenant d'un gisement infecté (Quiberon) en PCR quantitative (Robert et al., 2009). L'objectif était d'étudier la fréquence de détection et la charge parasitaire en fonction des organes.

Ainsi 50 animaux ont été analysés par cet outil sur six organes : branchies, manteau, glande digestive, gonade, palpes labiaux et muscle adducteur. Sur 50 huîtres testées, 20 ont présenté au moins un organe positif en PCR quantitative : 30% au niveau des branchies, 28% au niveau des palpes labiaux et du muscle adducteur, 18% au niveau de la gonade et 8% au niveau de la glande digestive. Les plus fortes charges parasitaires (>500 copies/ μ l) ont été détectées dans le manteau, les branchies et les palpes labiaux avec une charge maximale de $2 \cdot 10^8$ copies/ μ l mesurée dans un prélèvement de palpes labiaux (Figure 26).

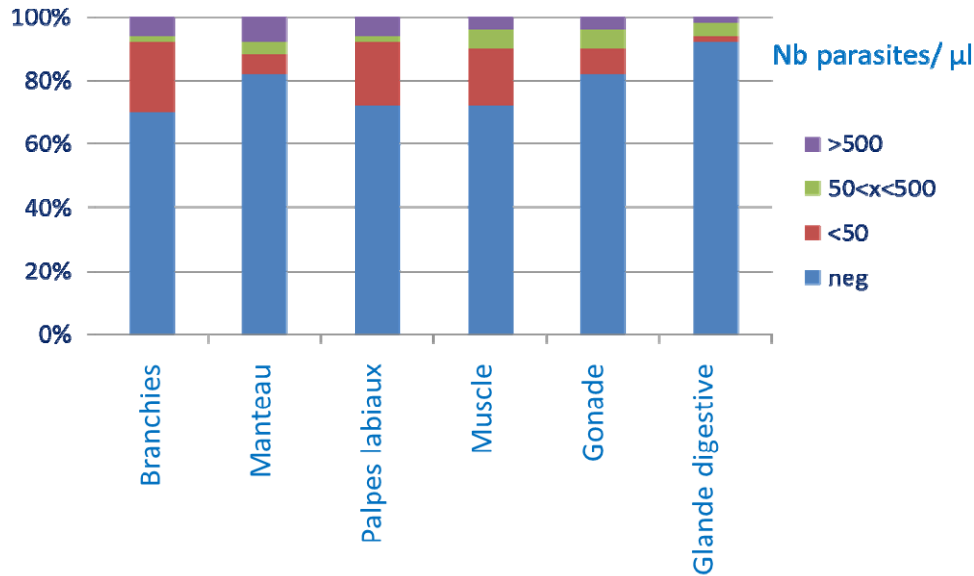


Figure 26. Résultats obtenus en PCR quantitative par organe (neg= absence de détection d'ADN de parasite)

L'ensemble de ces résultats confirme que les branchies sont les organes les plus souvent infectés et donc constituent une cible de choix pour le diagnostic de la bonamiose y compris dans les cas de faible niveau d'infection. Nos observations démontrent une forte implication des organes palléaux dans le développement de l'infection. Des résultats similaires ont été rapportés pour le parasite *Perkinsus marinus* et son hôte *Crassostrea virginica* (Allam et al., 2012).

Nous proposons à partir de nos résultats le schéma présenté en Figure 27. L'observation du parasite au niveau des épithéliums des branchies, manteau et glande digestive dans les cas de faible infection suggère une entrée du parasite par les épithéliums des organes palléaux et la voie digestive. Cette infection de nouvelles huîtres a été observée au plus tôt 18 jours après le début de notre expérience de cohabitation. Une fois passé la barrière épithéliale, le parasite est phagocyté par les hémocytes et distribué dans tous les organes. L'observation du parasite dans les épithéliums branchiaux du manteau et dans la gonade dans les cas de forte infection laisse penser que le parasite peut sortir de son hôte par ces organes. L'observation de fortes infections se produit 40 jours ou plus après la première détection du parasite dans les huîtres testées dans notre étude. Après ce délai, le parasite peut alors infecter de nouvelles huîtres.

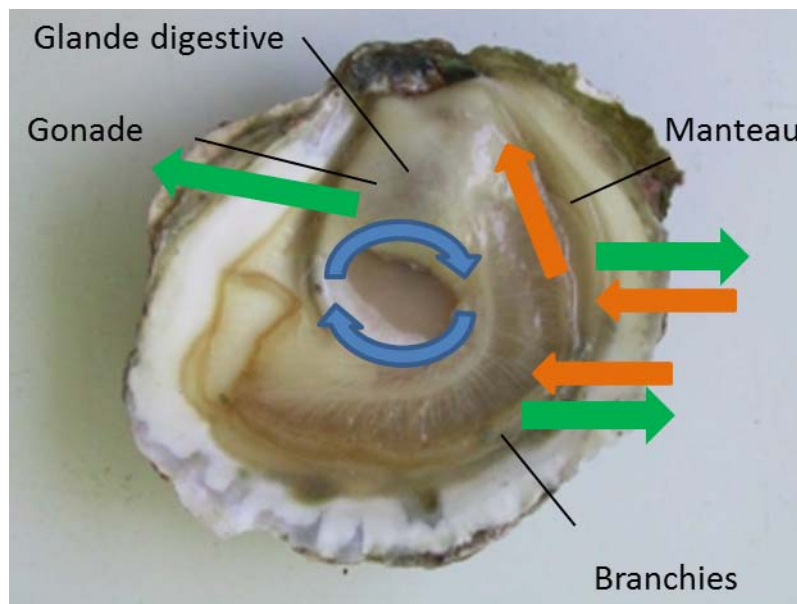


Figure 27. Proposition de cycle pour *Bonamia ostreae* dans son hôte *Ostrea edulis* : entrée par les organes palléaux et la vie digestive (flèches orange), distribution par les hémocytes à l'ensemble des organes (flèches bleues), sortie par les organes palléaux et la gonade (flèches vertes)

2. - Survie dans l'eau de mer

La bonamiose a été rapportée dans différents écosystèmes depuis les estuaires jusqu'en pleine mer et aucune corrélation n'a pu être démontrée entre le développement de la maladie et des paramètres environnementaux telles que température et salinité. Le cycle de vie du parasite en dehors de son hôte n'est pas complètement élucidé. Néanmoins, l'infection peut être directement transmise par cohabitation entre des huîtres infectées et non infectées, ce qui suggère que le parasite n'a pas besoin d'hôte intermédiaire pour accomplir son cycle et qu'il est transmis via l'eau de mer. Dans ce contexte, l'impact de la température et de la salinité sur la survie de parasites purifiés maintenus en eau de mer a été étudié en cytométrie en flux (Arzul et al., 2009).

Des parasites purifiés ont été incubés dans trois milieux différents d'eau de mer filtrée à 0,22 μm (eau de mer artificielle, eau de mer "naturelle" prélevée dans La Seudre Charente Maritime, France; eau de forage) et ont été soumis à trois températures (4, 15 et 25°C). Puis des parasites maintenus en eau de forage à 15°C ont été soumis à une gamme de salinités (5, 15, 20, 25, 30, 35, 40 et 45 g/l). Les parasites ont été prélevés après 12, 48 heures et 1 semaine pour apprécier la mortalité et les activités de type estérase du parasite en cytométrie en flux.

Les résultats obtenus montrent que le parasite présente une meilleure survie en eau de forage et eau de mer "naturelle" par rapport à l'eau de mer artificielle. La survie et les activités de type estérase du parasite sont plus faibles à 25°C qu'à 4°C ou 15°C.

Des fortes salinités (35, 40 et 45 g/l) semblent favoriser la survie et la vitalité du parasite (Figure 28). Après une semaine, les cellules parasitaires semblent généralement trop dégradées pour permettre une bonne interprétation des résultats en cytométrie en flux. Cependant jusqu'à 58% des parasites survivent après 1 semaine d'incubation en eau de forage à 15°C.

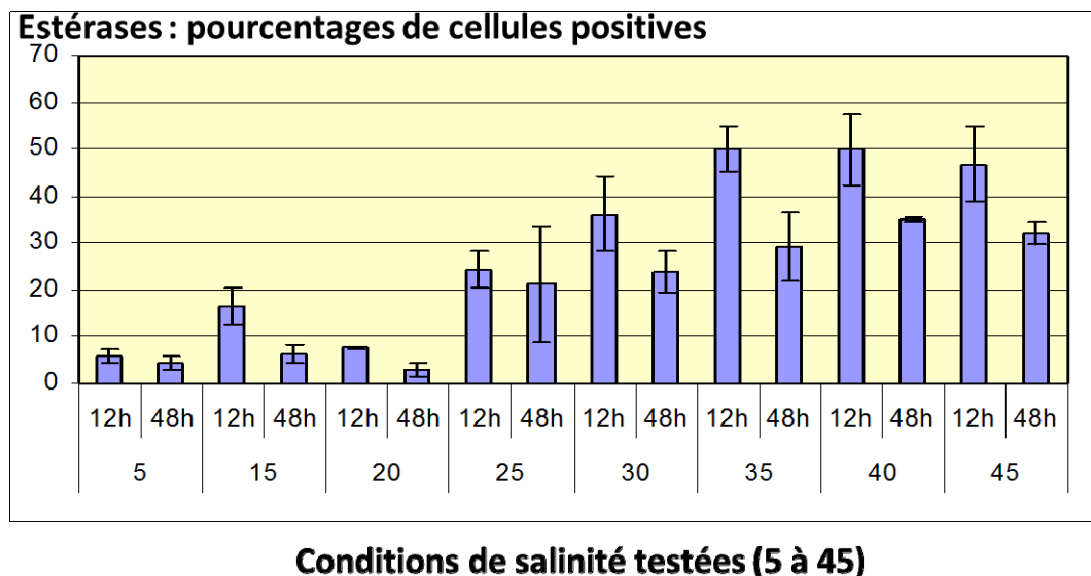


Figure 28. Pourcentages de cellules présentant des activités de type estérase après 12h et 48h d'incubation en eau de forage présentant différentes salinités (5, 15, 20, 25, 30, 35, 40 et 45 g/l). Les valeurs sont des moyennes des tri-reliquats et les barres représentent les erreurs standards.

La survie de parasites en eau de mer pendant plusieurs jours sous certaines conditions environnementales indique que la dispersion de *Bonamia ostreae* par les courants contribue certainement à élargir l'aire géographique de ce protozoaire tout du moins à l'échelle d'une baie ou de sites partageants des masses d'eau communes.

Cependant, une autre voie de dispersion a été investiguée par l'étude de la sensibilité des larves vis-à-vis du parasite.

3. - Sensibilité des larves à *Bonamia ostreae*

Les huîtres plates adultes sont considérées comme plus sensibles à l'infection à *Bonamia ostreae* que les jeunes stades (< 2 ans). Cependant des données récentes suggèrent que des huîtres de 6 mois peuvent être infectées et peuvent présenter des mortalités en association à la présence du parasite (Lallias et al., 2009). Aucune donnée n'était jusqu'alors disponible pour les larves. Nous avons profité d'un suivi de la reproduction de l'huître plate en Baie de Quiberon pour analyser des huîtres adultes incubant leurs larves (Arzul et al., 2011). En effet, les huîtres plates sont larvipares et incubent leurs larves pendant 8 à 10 jours avant de les libérer dans la colonne d'eau. La baie de Quiberon (Morbihan) est l'un des sites majeurs de captage de l'huître plate en France. Ce site est connu pour être affecté par la bonamiose depuis 1979. Les adultes dits ardoisés (incubant les larves) ont ainsi été prélevés pendant la période estivale en 2007, 2008 et 2009. Les analyses en PCR réalisées sur les adultes et les pools de larves correspondant ont permis de détecter de l'ADN de parasite de façon répétée sur les trois années d'étude. Les échantillons détectés positifs en PCR ont alors été sélectionnés pour des analyses complémentaires en hybridation *in situ*. Les huîtres adultes présentent un marquage positif au niveau des branchies, du manteau, de la masse digestive et de la gonade. Le parasite a également pu être détecté dans certaines larves au niveau de l'épithélium entourant la cavité viscérale suggérant que les larves s'infectent en ingérant les parasites (Figure 29). L'huître congénérique *Ostrea chilensis* incube également les embryons dans la cavité palléale. Il a été montré chez cette espèce que les larves sont capables d'ingérer les particules de 2 à 10 µm de diamètre présentes dans la cavité palléal de l'huître

adulte (Chaparro et al., 1993). Ces observations soutiennent l'hypothèse d'acquisition du parasite par ingestion chez les larves.

Pour la première fois nous avons mis en évidence la présence de *Bonamia ostreae* dans des larves d'huître plate (Arzul et al., 2011). Les larves au cours de leur phase planctonique pourraient donc contribuer à la dispersion du parasite.

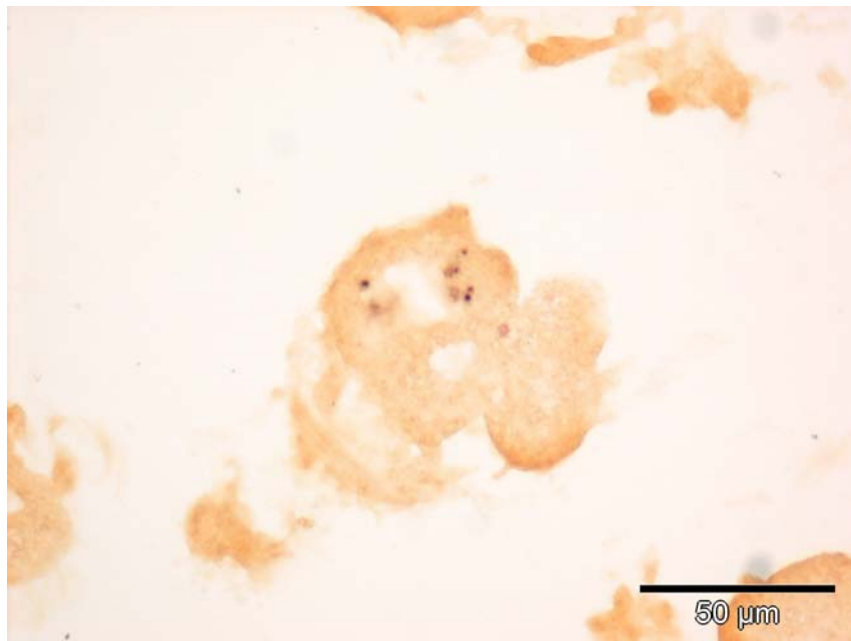


Figure 29- Détection de *Bonamia ostreae* par hybridation *in situ* dans une larve d'huître plate. Le marquage brun indique la présence du parasite. Contre coloration : jaune de Bismarck

Ainsi les résultats obtenus à travers ces études nous ont permis de montrer qu'il est possible de détecter le parasite dans une huître nouvellement infectée 18 jours après la mise en contact avec une source infectée. L'infection se développe et il est possible d'observer des images de parasite au niveau des épithéliums évoquant la sortie du parasite en dehors de son hôte 40 jours après son entrée. Le parasite peut alors infecter de nouvelles huîtres à proximité mais également via les courants et via la phase planctonique de la larve (Figure 30)

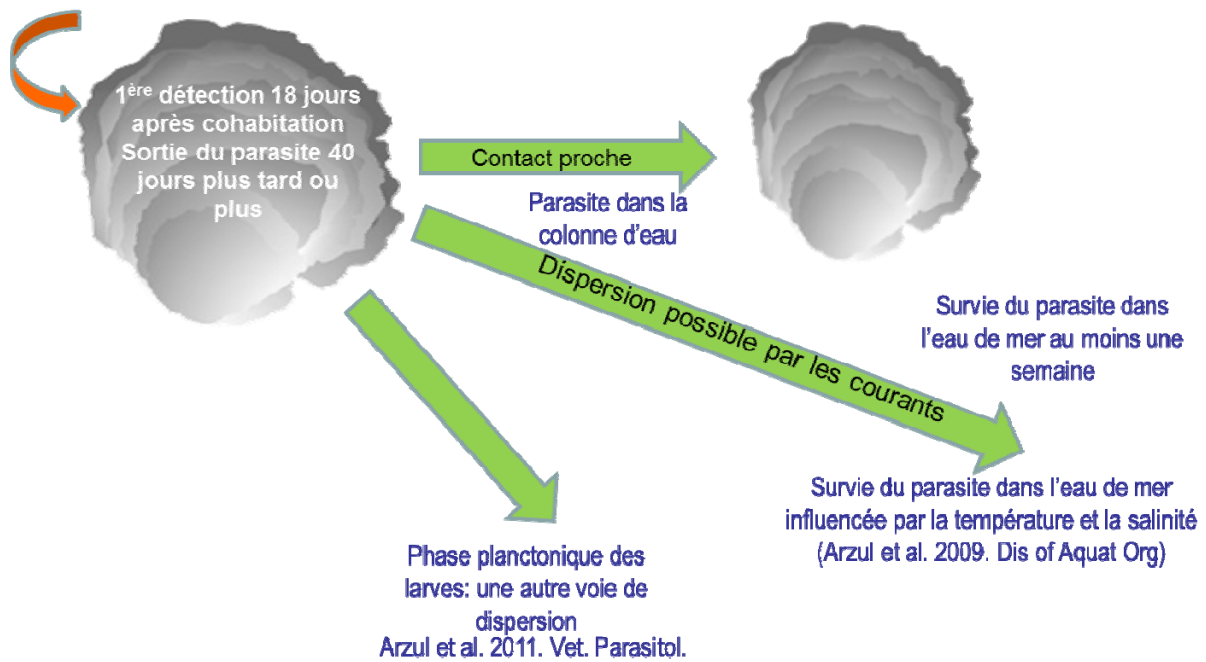


Figure 30. Synthèse des résultats obtenus concernant la dispersion du parasite *Bonamia ostreae* à partir de son hôte *Ostrea edulis*.

B. - Etude du cycle de *Marteilia refringens*

Depuis la première description de *Marteilia refringens* dans les huîtres plates *Ostrea edulis* en 1968 dans l'Aber Wrach, Bretagne, le cycle de vie de ce parasite reste non complètement élucidé. Suite à la mise en évidence de la nécessité d'hôtes intermédiaires pour l'accomplissement du cycle parasitaire, des études ont montré l'implication du copépode calanoïde *Acartia (Paracartia) grani* dans le cycle du parasite infectant les huîtres plates dans le système des claires ostréicoles (Audemard, 2001). Cependant, plusieurs essais de transmission expérimentale du parasite via le copépode ont été réalisés sans succès.

Ces résultats suggèrent le rôle possible d'autres espèces dans le cycle de vie et la transmission de *Marteilia refringens*. De plus, l'implication des moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* dans le cycle du parasite *M. refringens* pose des questions concernant la spécificité du parasite pour ses hôtes. Différentes études expérimentales et sur le terrain ont été entreprises afin de mieux comprendre le cycle du parasite et sont présentées ci-après.

1. Comparaison inter-sites de la dynamique d'infection à *Marteilia refringens* chez la moule

Les claires ostréicoles, au sein desquelles ont été conduites les précédentes études sur le cycle de *Marteilia*, sont des écosystèmes sélectifs dans la mesure où la biodiversité est

réduite et les fluctuations environnementales sont importantes (Audemard et al., 2004). Pour ces raisons, il semblait important de choisir des sites d'étude plus ouverts et complexes afin de vérifier les résultats précédemment obtenus en claires.

La dynamique de *Marteilia refringens* a ainsi été étudiée dans trois écosystèmes présentant davantage d'hydrodynamisme et plus riche en termes de diversité que les claires ostréicoles :

- les baies d'Alfacs et de Fangar dans le Delta de l'Ebre en Catalogne (Espagne) dans le cadre de la thèse de Noelia Carrasco
- la lagune de Diana en Corse dans le cadre du projet REMCO exploitation durable des Ressources Marines Corses)
- la lagune de Thau (Hérault) dans le cadre de la thèse de Séverine Boyer

Des données rapportant la présence du parasite étaient préalablement disponibles pour ces trois sites.

Les paramètres investigués dans le cadre de ces trois études sont synthétisés dans le Tableau 5. Les prélèvements de bivalves ont été réalisés mensuellement et les prélèvements de zooplancton tous les 15 jours.

Site d'étude	Période d'étude	Espèces bivalves étudiées	Température Salinité	Méthode détection	Références
Delta de l'Ebre (Baie d'Alfacs)	Oct 2004 - Oct 2005	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	8-29°C 23 -36	Histologie	(Carrasco et al., 2007)
Etang de Diana	Juin 2007 - Juin 2008	<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Ostrea edulis</i>	9-28°C 30-39	PCR	(Arzul et al., 2013)
Etang de Thau	Janv-Dec 2010	<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Venerupis decussata</i>	8-26°C Pas de donnée	PCR	(Boyer et al., 2013)

Tableau 5. Principales caractéristiques des trois études réalisées sur la dynamique du parasite *Marteilia refringens*

Les baies du Delta de l'Ebre sont un lieu important de production de coquillages tels que les moules mais également les huîtres creuses et plates, importées d'autres pays européens. Dans le cadre d'une étude préalable, des moules, huîtres plates et creuses avaient fait l'objet

d'analyses. *Marteilia refringens* n'avait pas été détecté chez *Crassostrea gigas* alors que sa présence avait été notée dans les huîtres plates *Ostrea edulis* entre mai et novembre avec des prévalences pouvant atteindre 16% et dans les moules tout au long de l'année avec des prévalences maximales de 20% (Carrasco et al., 2008a). Au cours de la période octobre 2004 à octobre 2005, seules les moules *Mytilus galloprovincialis* ont été suivies.

L'étang de Diana est un site de reproduction naturelle de l'huître plate *Ostrea edulis*. D'autres espèces y sont produites mais sont importées d'autres régions : l'huître creuse et les moules méditerranéennes. Le parasite *Marteilia refringens* a été régulièrement détecté au sein du gisement d'huîtres plates entre 1984 et 1988 avec des prévalences élevées (32 à 100%) puis en 2002 et 2005 avec des prévalences maximales de 13%. Dans notre suivi, aucune huître plate n'a été détectée infectée par le parasite ce qui pose des questions concernant l'éventuel développement d'une forme de résistance des huîtres plates vis-à-vis de la marteiliose ou d'un « détournement » du cycle du parasite par les moules.

L'étang de Thau est également un important site de production de coquillages, principalement d'huîtres creuses et de moules méditerranéennes. *Marteilia refringens* a été rapporté pour la première fois dans l'étang à la fin des années 70 dans *Ostrea edulis* (Comps, 1979). Aujourd'hui la population d'huîtres plates dans l'étang a pratiquement disparu. De ce fait, cette espèce n'a pu être incluse dans le suivi réalisé. En revanche, la palourde *Venerupis decussata* naturellement présente à Thau et proposée comme potentielle espèce hôte de *M. refringens* (voir Tableau 4) a fait l'objet de prélèvements et d'analyses parallèlement aux moules. Au cours de l'étude réalisée, de nombreuses palourdes ont été détectées positives en PCR. Les analyses complémentaires réalisées en hybridation *in situ* n'ont pas permis d'observer des images d'infection dans les tissus. Cependant des formes interprétées comme des parasites dégradés ont présenté un marquage spécifique au niveau de l'épithélium stomacal. Nos résultats indiquent plutôt que la palourde *V. decussata* n'est pas impliquée dans le cycle de *M. refringens* dans l'étang de Thau.

Une synthèse des suivis réalisés sur les moules *Mytilus galloprovincialis* dans les trois sites étudiés est proposée ci-dessous et dans la Figure 31.

Dans les trois études deux pics de prévalence ont pu être identifiés : l'un entre mars et mai et l'autre entre juillet et septembre. L'intensité de ces pics est variable en fonction de la période et de l'étude : autour de 15% dans le Delta de l'Ebre ou en Corse et 50% à Thau pour le pic printanier ; 26% à 80% pour le pic observé à la fin de l'été. Les moindres intensités relevées en Espagne peuvent en partie s'expliquer par la méthode de détection utilisée, l'histologie étant en général considérée comme moins sensible que la PCR.

L'augmentation de la prévalence est associée à une augmentation des stades matures et des forts niveaux d'infection. Les pics de prévalence traduisent donc l'infection de nouvelles moules mais également un développement de l'infection au sein des moules infectées.

Les diminutions de prévalence qui suivent les pics apparaissent plus (ex Diana) ou moins (Ebre, Thau) brutales et s'expliquent par un relargage des parasites dans le milieu et / ou par des mortalités des animaux infectés. Aucune mortalité anormale n'a cependant été observée lors des prélèvements dans le cadre de ces trois études ce qui tend à indiquer qu'une partie des moules éliminent avec succès le parasite à certaines périodes de l'année.

Le parasite est détecté tout au long des études conduites sur Thau et le Delta de l'Ebre tandis que les moules suivies sur Diana n'apparaissent plus infectées après le pic printanier. L'observation de stades matures (=pansporoblastes avec granules réfringents) s'étend du pic printanier au pic automnal ce qui suppose que le parasite peut être transmis au maillon suivant du cycle tout au long de cette période. Des stades réfringents ont toutefois également été observés en hiver comme par exemple en décembre et janvier dans l'étang de Diana indiquant que la sporulation peut se produire à des températures inférieures à 10°C.

Les données de prévalence semblent liées à l'évolution thermique de l'eau comme cela est décrit par Carrasco et al. (2007) ou mis en évidence par Boyer et al. (2013) pour des températures de l'eau inférieures à 21°C. Dans l'étang de Diana, la saisonnalité de la dynamique du parasite chez la moule apparaît légèrement positivement reliée à la température et la salinité.

Les prélèvements de zooplancton ont présenté des résultats positifs en PCR sur deux périodes (printemps et automne) à Diana et dans le delta de l'Ebre tandis que la détection du parasite semble continue sur Thau entre juin et novembre. Cette différence peut en

partie s'expliquer par le fait que le zooplancton prélevé à Thau a été trié afin de ne tester la présence de *Marteilia refringens* que dans l'espèce *Paracartia grani*.

La détection du parasite dans le zooplancton précède ou coïncide avec les deux pics de détection de *Marteilia refringens* dans les moules ce qui va dans le sens d'une transmission du parasite des copépodes vers les moules. On observe également une détection du parasite dans le zooplancton lorsque la prévalence diminue dans les moules ce qui laisse penser que le parasite est relargué en dehors des moules et « capturé » par le zooplancton.

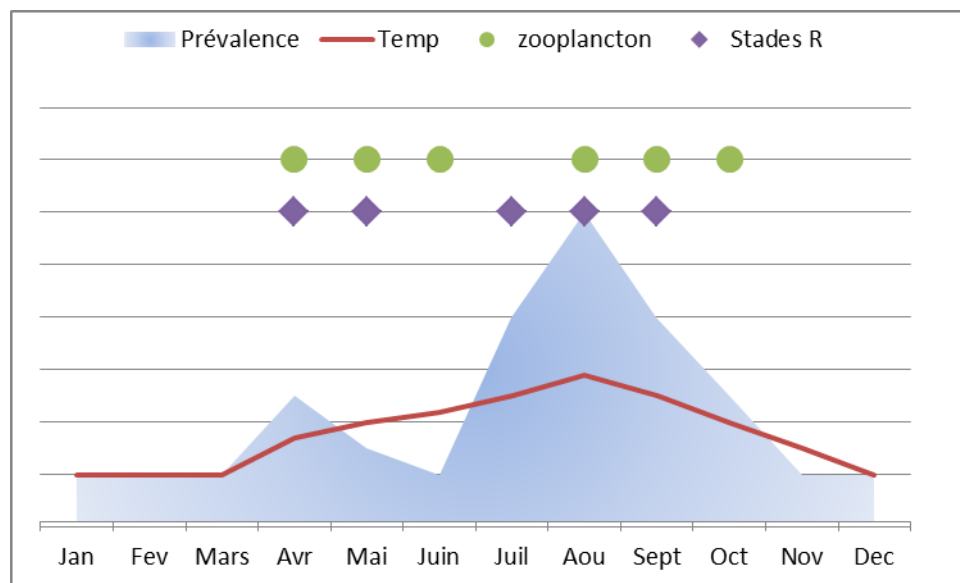


Figure 31. Proposition de dynamique annuelle de *Marteilia refringens* dans les moules *Mytilus galloprovincialis* sur la base des trois études (Arzul et al., 2013; Boyer et al., 2013; Carrasco et al., 2007). Aire bleue : prévalence de *M. refringens* dans les moules, courbe rouge : température de l'eau, points verts : détection du parasite dans le zooplancton, losanges bleus= détection de stades réfringents dans les moules.

Ces trois études nous révèlent une évolution bimodale de la prévalence et du développement de l'infection dans les moules (Figure 31). La dynamique du parasite dans les moules semble corrélée à l'évolution de la température de l'eau et surtout à la dynamique du parasite dans le compartiment zooplanctonique (Figure 31).

Dans des études réalisées précédemment sur la marteiliose, l'évolution de la prévalence de la maladie dans les huîtres plates semble uni modale, l'infection de nouvelles huîtres ne se produisant qu'au cours de la période estivale (Balouet et al., 1979; Grizel, 1985). Cependant, le suivi des niveaux d'infection réalisé dans les claires ostréicoles avait révélé deux périodes d'infection maximale, avril et septembre. Le pic printanier n'est donc associé à une

augmentation de prévalence et correspondrait à une période de multiplication intense du parasite dans les huîtres (Audemard et al., 2004). Dans l'étude de la dynamique du parasite au sein des claires, les deux pics d'infection maximale précèdent la détection du parasite dans les copépodes *Paracartia grani* (Audemard et al., 2004).

La prévalence de l'infection à *Marteilia refringens* a également été suivie dans des moules *Mytilus galloprovincialis* dans différentes baies de Galice. Cette étude avait révélé une variabilité spatiale importante. Les sites localisés à l'intérieur des baies présentaient des prévalences plus importantes que les sites plus océaniques. L'évolution temporelle de l'infection dans les sites les plus infectés montrait que la sporulation pouvait se produire toute l'année (Villalba et al., 1993c). De plus, plusieurs pics de prévalence associés à de fortes infections étaient observés au cours de l'année en particulier après la période de ponte (Villalba et al., 1993b).

Ainsi, si l'infection à *Marteilia refringens* dans les moules *Mytilus galloprovincialis* évolue de façon équivalente dans les trois sites que nous avons étudiés, des différences sont notées avec la dynamique de l'infection dans d'autres sites plus océaniques tels que les baies en Galice et dans un autre hôte, l'huître plate.

2. Interactions entre *Marteilia refringens* et zooplancton

Les prélèvements de zooplancton détectés positifs en PCR dans le cadre des études réalisées dans l'étang de Diana et dans la baie d'Alfacs présentées dans la partie précédente ont été triés de façon à identifier et séparer les espèces présentes.

Parmi les prélèvements triés provenant du Delta de l'Ebre, six taxons zooplanctoniques différents sont apparus positifs en PCR dont des copépodes (trois Calanoïdes, *Acartia discaudata*, *A. clausi* et *A. italica*; un Cyclopoïde, *Oithona* sp.; et un Harpacticoïde, *Euterpina acutifrons*), et des stades larvaires de crustacés décapodes (larves zoe de Brachyure, probablement *Portumnus* sp.) (Carrasco et al., 2007). Ces taxons ont été proposés comme potentiels nouveaux hôtes intermédiaires de *Marteilia refringens*. Cependant, ces résultats reposent sur des analyses en PCR et sont donc indicatifs de présence d'ADN du parasite. Ils

ne peuvent nous permettre à ce stade de conclure quant à leur réelle implication dans le cycle du parasite.

Différents groupes de zooplancton ont été observés dans les prélèvements de Diana détectés positifs avant tri: copépodes, appendiculaires, cladocères, chaetognates, larves de polychètes, décapodes, échinodermes, nauplii de cirripèdes et œufs de poisson. De nombreux résultats positifs ont été obtenus en PCR, parfois pour tous les prélèvements testés tels que les copépodes du genre *Oithona*, les copépodes *Paracartia latisetosa* et les cladocères du genre *Evadne* (Arzul et al., 2013).

L'ensemble des échantillons triés détectés positifs en PCR a été analysé en hybridation *in situ* (Le Roux et al., 1999) afin de pouvoir différencier une infection d'un portage du parasite. Les analyses ont été répétées en particulier pour les trois taxons détectés systématiquement positifs en PCR. Finalement, seule une espèce a présenté des résultats positifs en hybridation *in situ* : le copépode *Paracartia latisetosa*. Les cellules parasitaires apparaissent nombreuses, de petites tailles (1-2 μm) et localisées dans le tissu gonadique des femelles copépodes (Figure 32).

Ces résultats soulignent l'importance de combiner des outils moléculaires et histologique afin de confirmer une infection et l'implication potentielle d'une espèce dans un cycle parasitaire. Par ailleurs les nombreux prélèvements de zooplancton détectés positifs en PCR suggèrent que le parasite est présent en grande quantité dans la lagune à certaines périodes de l'année.

Ainsi, nous avons démontré qu'une espèce de copépode autre que *Paracartia grani* peut être infectée par le parasite *Marteilia refringens*. L'espèce *P. grani* n'a pas été observée dans le zooplancton prélevé dans l'étang de Diana. Il est intéressant de noter que *P. grani* et *P. latisetosa* ne semblent pas capables de co habiter. En effet, *P. grani* a été rapporté dans les claires ostréicoles et à Thau (Audemard et al., 2001; Boyer et al., 2012) tandis que *P. latisetosa* est aujourd'hui présent à Diana et était autrefois présent à Thau avant l'arrivée de *P. grani* dans la lagune (Boyer et al., 2012).

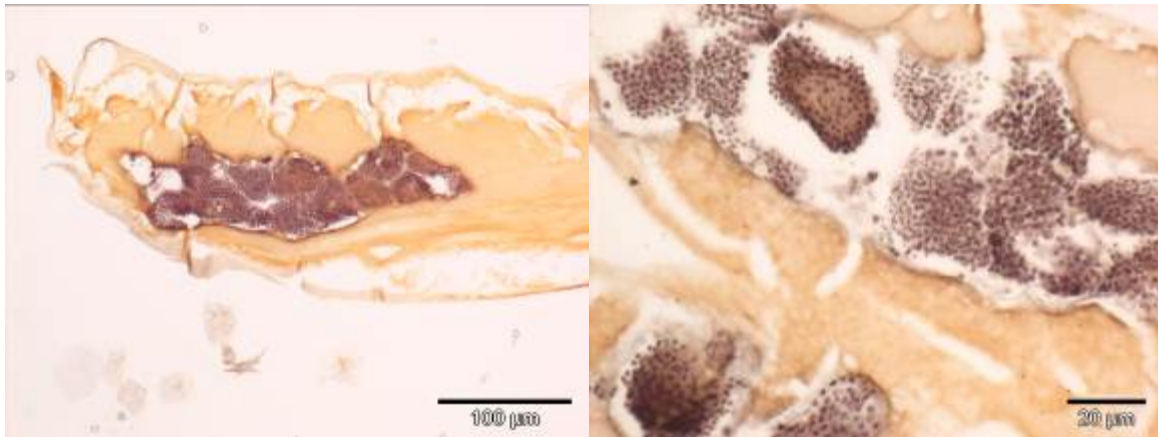


Figure 32. Analyse en hybridation *in situ* (Le Roux et al., 1999) permettant de détecter et localiser le parasite *Marteilia refringens* dans une femelle copépode *Paracartia latisetosa* (le marquage brun correspond au parasite, contre-coloration= jaune de Bismarck)

3. Interactions entre *Marteilia refringens* et *Paracartia grani*

Le rôle du copépode *Paracartia grani* dans le cycle du parasite *Marteilia refringens* ayant précédemment été mis en évidence dans les claires ostréicoles, des nouveaux travaux ont été entrepris au niveau de la lagune de Thau dans le cadre de la thèse de Séverine Boyer (Boyer, 2012). La connaissance de la biologie et dynamique de population de cette espèce zooplanctonique semble effectivement importante pour mieux comprendre le cycle du parasite.

Biogéographie de Paracartia grani

Paracartia grani a été pour la première fois rapporté en Europe du Nord (Royaume Uni et Norvège). Ces vingt dernières années, cette espèce a progressivement été décrite le long des côtes Méditerranéennes, tout d'abord près du détroit de Gibraltar en 1984, dans l'étang de Thau en 1998 et plus récemment en Adriatique (Figure 33 ; Boyer et al. 2012). L'introduction de *P. grani* en mer Méditerranée peut s'expliquer par une migration naturelle via le détroit de Gibraltar ou pourrait être la conséquence d'activités humaines telles qu'un transport par les eaux de ballast ou par le transfert de coquillages à des fins d'aquaculture.

La distribution européenne de ce copépode se superpose à la distribution actuellement connue du parasite *Marteilia refringens* qui a été rapporté depuis la Suède jusque dans le bassin méditerranéen en passant par la côte atlantique (Figure 33).

Une étude comparative des abondances de différentes espèces d'Arcatiidae dans la lagune de Thau montre que *Paracartia grani* et *P. latisetosa* sont les espèces les plus abondantes en août tandis que les espèces *Acartia clausi* et *A. discaudata* présentent des pics d'abondance entre Janvier et Avril puis en Novembre-Décembre. Par ailleurs l'analyse de données historiques sur ce secteur met en évidence une quasi disparition de *P. latisetosa* depuis la première description de *P. grani* dans la lagune démontrant ainsi un changement des populations d'Arcatiidae sur ce site (Boyer et al. 2012).

Marteilia refringens a été pour la première fois rapporté à Thau chez des huîtres plates *Ostrea edulis* à la fin des années 70 (Comps, 1979). Ces huîtres étaient originaires de Bretagne et auraient ainsi transmis le parasite aux populations locales. Aujourd'hui cette espèce a quasiment complètement disparu de la lagune. La présence du parasite aurait donc précédé l'introduction de *Paracartia grani* dans la lagune.

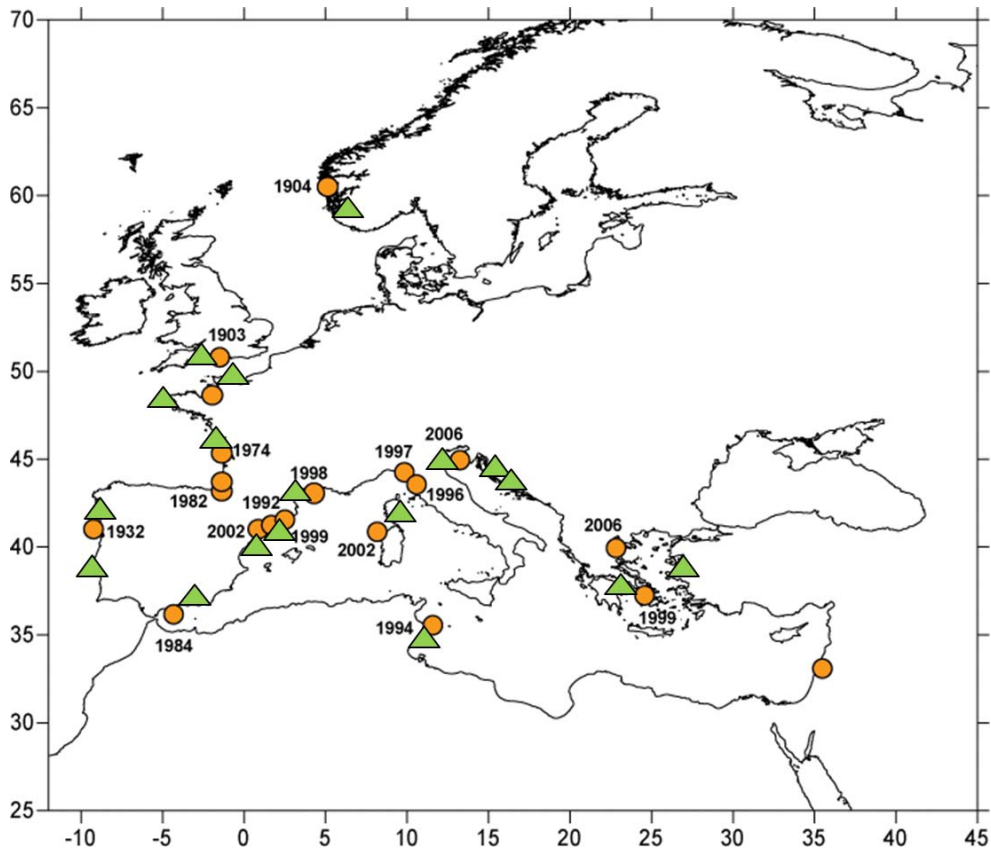


Figure 33. Distribution du copépode *Paracartia grani* (ronds orange) et de *Marteilia refringens* (triangles verts). Les années correspondent aux premières descriptions de *P. grani* (Boyer et al. 2012).

Stades copépodes et Marteilia refringens

La contribution de l'espèce *Paracartia grani* au mésozooplancton dans la lagune de Thau a été étudiée en 2010 (Boyer, 2012, Figure 34). Cette espèce apparaît dans la colonne d'eau en avril mais sa présence ne devient significative qu'en juillet et présente un pic en septembre où elle contribue pour 10% au mésozooplancton. Puis elle devient rare dans la colonne d'eau (<50 individus /m³) et disparaît. Les différents stades de *P. grani* ont été triés à chaque prélèvement réalisé et analysés en PCR pour tester la présence de *Marteilia refringens*.

Le parasite est détecté en PCR dans les copépodes *Paracartia grani* de juin à novembre, le plus souvent sur les stades les plus âgés, c'est-à-dire adultes et copépodites de stade V, mais également sur les stades plus jeunes en août-septembre lorsque l'abondance du copépode est maximale dans la lagune (Figure 34; Boyer et al., 2013). Il est intéressant de noter qu'à

l'exception d'un échantillon de stade CV mâles, les copépodes des stades CIV, CV et CVI détectés positifs sont des femelles.

Ainsi la période à laquelle *Paracartia grani* est détecté positif en PCR suit le premier pic et englobe le deuxième pic de prévalence chez la moule. *Marteilia refringens* est préférentiellement détecté dans les femelles copépodes mais la présence d'ADN du parasite dans des stades plus jeunes et dans un échantillon de copépodites mâles indique qu'ils sont également susceptibles de contribuer à la transmission du parasite.

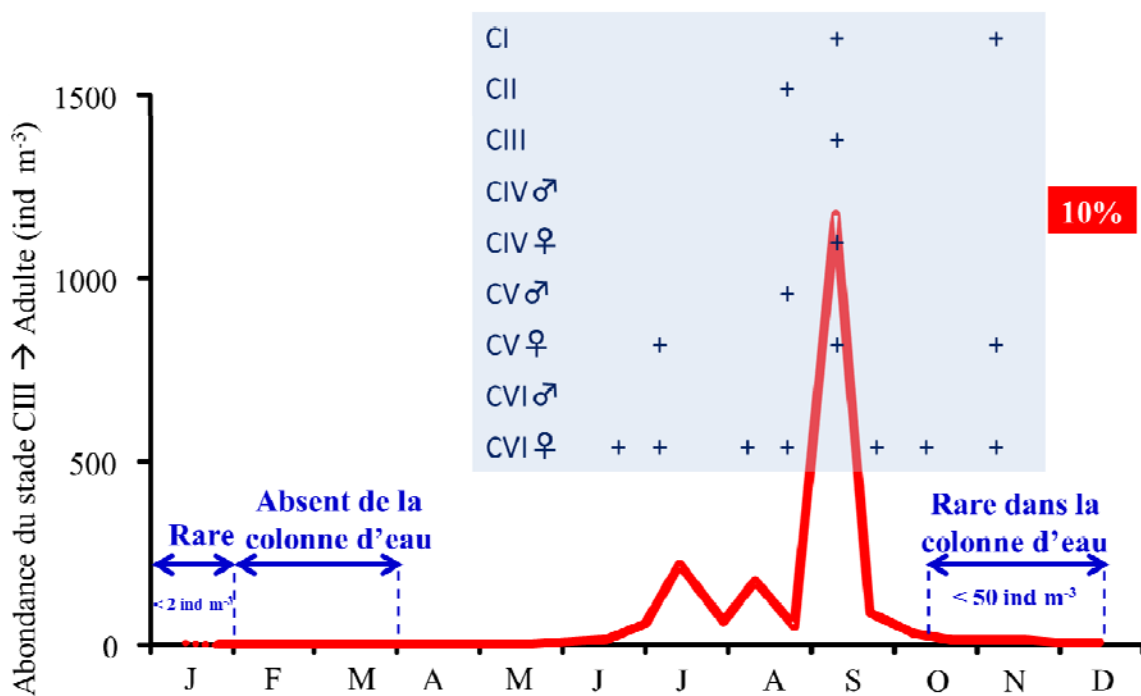


Figure 34. Evolution annuelle de l'abondance de *Paracartia grani* et détection de *Marteilia refringens* dans les différents stades de développement du copépode. L'abondance est indiquée par la courbe rouge (nombre de copépodes du stade CIII au stade adulte / m³). En septembre, cette espèce contribue pour 10% du mésozooplancton sur le site de prélèvement. Le cadre bleu indique les résultats obtenus par PCR pour la détection de *M. refringens* dans les différents stades de développement du copépode en fonction des mois de prélèvement.

Distribution parasitaire dans les copépodes

Les échantillons de *Paracartia grani* prélevés à Thau et détectés positifs par PCR ont été sélectionnés pour des analyses en hybridation *in situ* (Le Roux et al., 1999). *Marteilia refringens* a ainsi été observé dans les tissus ovariens des femelles adultes et CV mais également pour la première fois dans des stades plus jeunes, des copépodites CIII. A ce stade le parasite est présent dans le canal alimentaire, l'épithélium digestif ainsi qu'au niveau du site germinal du tissu ovarien (Boyer et al., 2013 ;Figure 35).

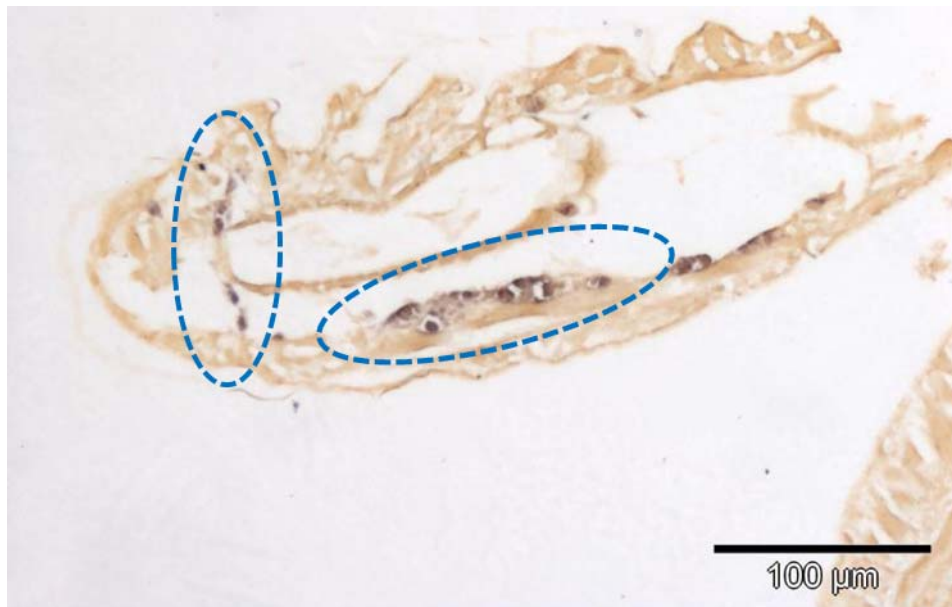


Figure 35. Distribution de *Marteilia refringens* dans un stade copépodite CIII de *Paracartia grani*. On note le marquage au niveau du conduit alimentaire et du tissu ovarien. Hybridation *in situ* (Le Roux et al., 1999) contre coloration jaune de Bismarck.

De plus, des femelles copépodes détectées positives en PCR ont été sélectionnées pour réaliser des pontes expérimentales. Ainsi, cinq expériences ont été réalisées entre Septembre et Novembre, et les œufs récupérés ont été analysés par pool de 30 en PCR. Deux « pools » d'œufs provenant de la même ponte ont été détectés positifs par PCR. Le séquençage de ces produits de PCR a permis de confirmer la spécificité des amplicons obtenus. Ces résultats ne nous permettent pas de démontrer que les œufs sont réellement infectés par le parasite car celui-ci peut être présent en surface et être dégradé. Cependant,

ils nous autorisent à penser que l'émission des œufs peut être une voie de sortie du parasite des copépodes.

L'ensemble de ces résultats indique une possible ingestion du parasite par les copépodes, dès les stades copépodites CIII et une migration du parasite vers les tissus gonadiques, plus particulièrement femelles. Le parasite se multiplierait alors sans pour autant bloquer la production et l'émission d'œufs potentiellement contaminés.

Les œufs pourraient ainsi contribuer à (i) disperser le parasite car de nombreux œufs sont produits par *Paracartia grani* pendant la période potentielle de transmission de *Marteilia refringens* (jusqu'à 20.4 œufs femelle et par jour en septembre, Boyer et al. 2013) et (ii) à héberger le parasite pendant l'hiver car *P. grani* produit des œufs de diapause d'octobre à décembre dans la lagune (Boyer and Bonnet, 2013).

4. Interactions entre moules et copépodes *Paracartia grani*

De la moule vers Paracartia grani

Le copépode *Paracartia grani* a été identifié comme hôte potentiel intermédiaire dans le cycle de *Marteilia refringens* infectant l'huître plate *Ostrea edulis*. Cependant, aucun hôte intermédiaire n'avait encore été identifié pour le parasite infectant les moules, parasite précédemment considéré comme espèce proche mais distincte de *M. refringens* et appelé *M. maurini*.

Des essais de transmission du parasite à des copépodes *Paracartia grani* ont donc été réalisés à partir d'huîtres plates *Ostrea edulis* et de moules *Mytilus galloprovincialis* naturellement infectées (Carrasco et al., 2008b). Pour cela, des copépodes mis en culture au laboratoire à partir de sédiments recueillis dans une claire ostréicole ont été exposés pendant 7 jours à des sporanges de parasites provenant des faeces des huîtres et moules infectées. Les copépodes ainsi exposés ont été recueillis et traités pour être analysés en hybridation *in situ* (Le Roux et al., 1999).

Les résultats obtenus mettent en évidence des différences entre les deux conditions testées : sur quatre essais d'infection réalisés à partir de moules infectées, deux seulement ont permis de détecter le parasite dans les copépodes tandis que les quatre essais réalisés à partir d'huîtres plates ont tous été positifs. Une plus forte affinité du parasite provenant des huîtres pour *Paracartia grani* semble observée dans nos conditions expérimentales. De plus, la localisation et les formes parasitaires observées chez les copépodes sont différentes en fonction de la source de *Marteilia refringens*. Les copépodes infectés à partir du *Marteilia* des moules se présentent sous la forme de cellules primaires ou secondaires uni et bi nucléés similaires aux formes décrites dans l'épithélium de l'estomac des mollusques. Dans le cas des copépodes infectés à partir du *Marteilia* des huîtres plates, plus de stades avancés du parasite sont observés au niveau de la gonade. L'observation en hybridation *in situ* des copépodes infectés par *M. refringens* provenant des huîtres plates a ainsi permis de proposer le cycle de développement suivant : chez les copépodes, les cellules uni- et binucléées sont observées dans l'épithélium digestif et deviendraient des « cellules souches » à l'intérieur desquelles se multiplieraient des cellules amiboïdes filles. Les « cellules souches » migreraient ensuite via les tissus conjonctifs vers les tissus gonadiques où elles formeraient des pseudoplasmodies contenant une large quantité de petites cellules. Cette hypothèse de migration a été initialement proposée par Kleeman et al. (2002) pour le parasite *Marteilia sydneyi* chez l'huître australienne *Saccostrea commercialis*.

Du copépode vers la moule

Si *Marteilia refringens* semble bien infecter les copépodes en tant qu'hôtes intermédiaires, une question se pose concernant la voie de transmission du parasite des copépodes vers les bivalves. Une hypothèse consiste à proposer que le copépode est filtré puis ingéré par les bivalves. Afin de tester l'éventualité de cette hypothèse, une expérience de mise en contact entre moules *Mytilus edulis* et les différents stades du copépode *Paracartia grani* a été réalisée. L'efficacité de rétention du copépode par la moule a été mesurée au bout d'une heure pour chaque stade de développement du copépode: œufs, nauplii, copépodites de stades CI-CII, CIII-CIV, CV et adultes.

Quel que soit le stade du copépode, il est retenu par la moule (Figure 36). On observe cependant une rétention maximale (90%) pour les plus jeunes stades (œufs et nauplii) alors que les stades plus âgés présentent un taux de rétention de 20 à 40%. Ces résultats indiquent que tous les stades peuvent être retenus par la moule et sont donc susceptibles de transmettre le parasite aux bivalves avec une efficacité probablement plus importante pour les jeunes stades.

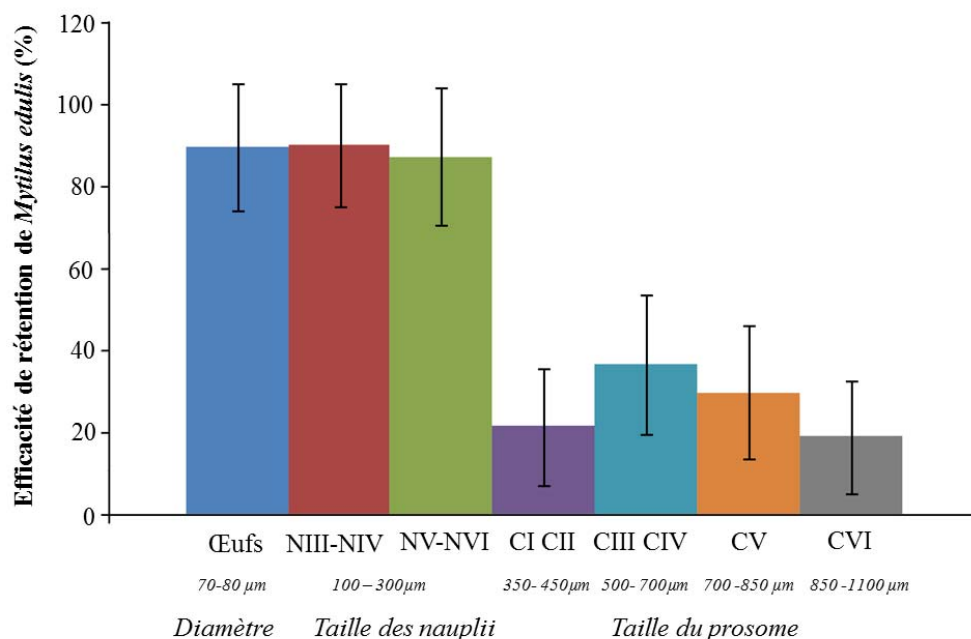


Figure 36. Efficacité de rétention des différents stades de copépode par la moule.

L'ensemble des résultats obtenus est synthétisé à travers la Figure 37. Au cours du printemps, le parasite infecte de nouvelles moules et s'y développe, le copépode qui apparaît dans la colonne d'eau s'infecte également. Au cours de l'été et surtout de l'automne, le parasite est transmis entre moules et copépodes. *Paracartia grani* disparaît de la colonne d'eau l'hiver mais à la capacité de produire des œufs de diapause. Le parasite se maintient sous la forme de jeunes stades dans les moules au cours de la période hivernale et pourrait également passer l'hiver dans les œufs de diapause.

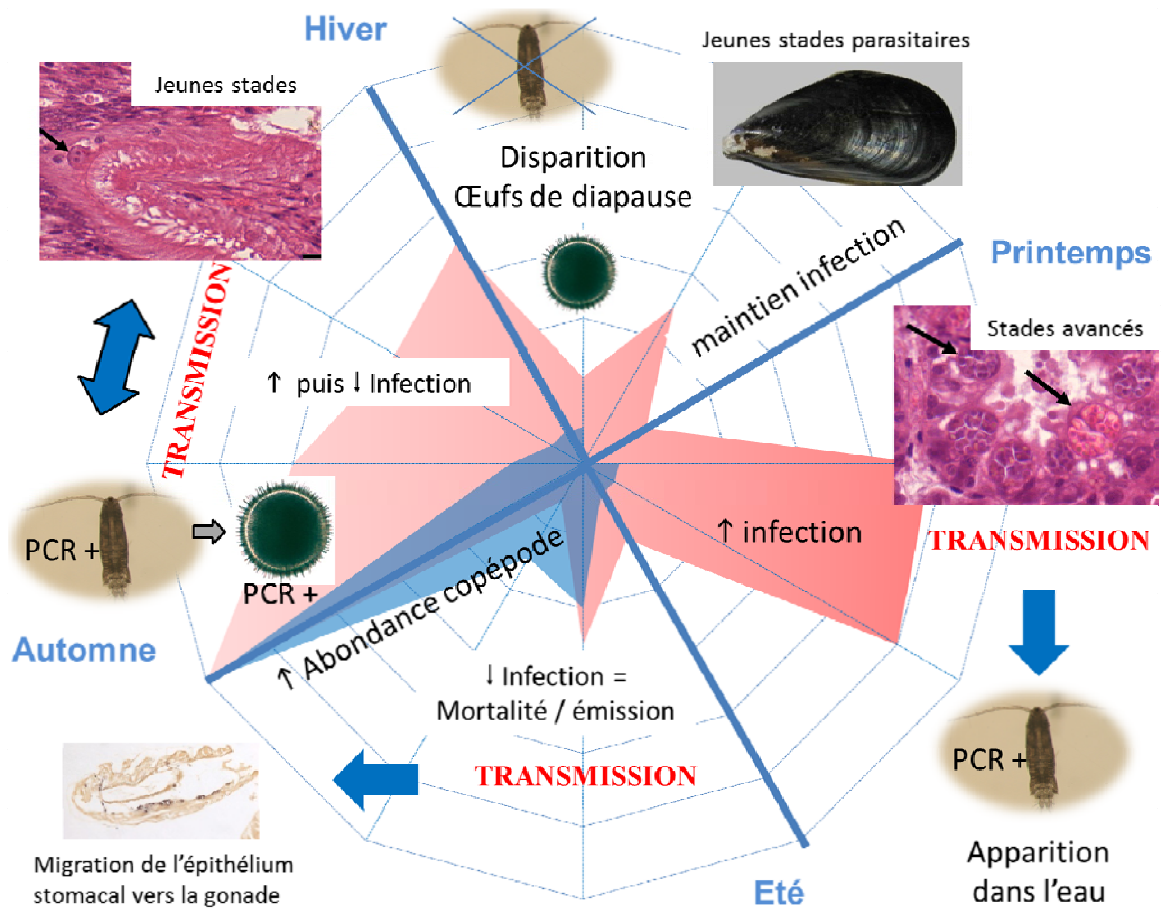


Figure 37. Synthèse des résultats obtenus concernant la dynamique d'infection des moules *Mytilus galloprovincialis* et du copéptide *Paracartia grani* dans la lagune de Thau. Aire rose= fréquence de détection du parasite dans les moules. Aire bleue= prévalence de *P. grani* dans la colonne d'eau.

C. Conclusion

Les travaux réalisés concernant le cycle de *Bonamia ostreae* mettent en évidence l'importance des organes palléaux dans l'entrée et la sortie du parasite de son hôte. Nos résultats montrent que le parasite peut également entrer par le système digestif supposant une possible transmission par consommation et semble sortir au niveau de la gonade en contaminant les larves. La survie du parasite dans l'eau de mer est influencée par des facteurs tels que la température et la salinité mais permet très certainement au parasite d'être dispersé par les courants et d'atteindre de nouvelles huîtres à proximité ou à distance

des huîtres infectées. La larve est le seul stade mobile de l'huître et pendant sa phase planctonique semble pouvoir contribuer à la dispersion du parasite.

Ces résultats contribuent à améliorer notre connaissance de la biologie du parasite mais présentent aussi des conséquences en termes de contrôle et de gestion de cette maladie. En effet, la détection du parasite au niveau des larves impliquent la mise en place de mesure de restriction de transferts à partir d'éventuelles éclosures produisant cette espèce d'huître.

L'étude de l'évolution de *Marteilia refringens* dans des moules *Mytilus galloprovincialis* dans trois sites géographiques différents nous permet de proposer une dynamique « consensus » du parasite dans cette espèce à savoir une évolution bimodale avec des premières infections de bivalves survenant au printemps puis un pic de prévalence observé à la fin de l'été, pic qui coïncide avec le pic d'abondance du copépode *Paracartia grani* dans la lagune de Thau. La comparaison de l'évolution de *M. refringens* dans les moules et dans le zooplancton met en évidence la transmission du parasite entre les deux compartiments du printemps à l'automne. Le copépode *P. grani* disparaît de la colonne d'eau en hiver mais a la capacité de produire des œufs de diapause, stades qui lui permettent de passer l'hiver.

Nous avons montré qu'une autre espèce du même genre, *Paracartia latisetosa* pouvait être infectée par *Marteilia refringens* le parasite présentant la même distribution que dans *P. grani*. Ainsi même si la biogéographie de *P. grani* se superpose bien à la distribution de *M. refringens*, d'autres espèces de copépode sont susceptibles de participer à la transmission du parasite en l'absence de *P. grani*. Le cycle de *M. refringens* reste à ce jour non complètement élucidé. Néanmoins nos résultats nous ont permis d'apporter des précisions concernant les interactions entre le copépode et le parasite et entre le copépode et la moule.

Ainsi les travaux réalisés contribuent à améliorer notre connaissance des cycles de ces parasites protozoaires mais des questions restent posées concernant la ou les formes prise(s) par *Bonamia ostreae* en dehors de son hôte *Ostrea edulis* et concernant la transmission de *Marteilia refringens* du zooplancton vers les bivalves.

V. Hôte-parasite : la course aux armements

Dans un système hôte-parasite des pressions sélectives réciproques tendent à s'exercer : les hôtes sélectionnent les parasites les plus « performants » et les parasites eux-mêmes sélectionnent les hôtes qui se « défendent le mieux ».

La théorie de la Reine Rouge est une hypothèse de biologie évolutive proposée par Leigh Van Valen (Van Valen, 1973) selon laquelle l'évolution permanente d'une espèce est nécessaire pour maintenir son aptitude à survivre suite à l'évolution des espèces avec lesquelles elle coévolve. Le nom de l'hypothèse de la Reine Rouge est emprunté à la nouvelle de Lewis Carroll, « Alice à travers le miroir », dans laquelle Alice court au côté de la Reine Rouge et note avec surprise que le paysage autour d'elle ne change pas. La Reine explique alors à Alice que c'est pour rester sur place qu'elles courent. Cette image est ainsi souvent utilisée pour illustrer l'évolution permanente des espèces hôtes qui doivent se défendre contre les parasites et des parasites eux-mêmes qui développent des mécanismes pour échapper à la réponse de l'hôte.

Une fois le filtre de rencontre franchi, le parasite doit mettre en place des mécanismes afin de survivre dans un milieu qui lui est hostile. Mais pour survivre, le parasite doit également ménager son hôte et donc adapter sa virulence.

La définition de la virulence diffère entre le pathologiste qui mesure l'effet pathogène du parasite, ou l'ensemble des conséquences de la présence du parasite dans un hôte (e.g. conséquences sur la morphologie, l'anatomie, le métabolisme, le comportement...) et l'écologue qui mesure la diminution du succès reproductif qu'il provoque chez son hôte. Aussi pour l'écologue, plus un parasite est virulent, moins abondante est la descendance de son hôte et par conséquent moins grande la transmission des gènes de cet hôte à la génération suivante. La mesure de la virulence n'est donc pas aisée (Poulin and Combes, 1999). Elle est très souvent appréciée par une seule de ses composantes, telle que la mortalité de l'hôte (Ebert and Mangin, 1997) ou de manière indirecte par l'effet pathogène, ce qui suppose alors qu'il y ait proportionnalité entre pathologie et virulence. L'effet

pathogène apparaît comme essentiel à l'échelle de l'individu tandis que la virulence est importante lorsqu'on se place à l'échelle de l'évolution.

Le modèle hôte-parasite *Ostrea edulis/Bonamia ostreae* apparaît comme un modèle d'intérêt pour la compréhension des interactions invertébré-parasite. En effet, la possibilité d'isoler le parasite (Miahle et al., 1988) a largement aidé à reproduire et modéliser la bonamiose au laboratoire (Hervio, 1992). Par ailleurs, les possibilités de purification du parasite et la primoculture d'hémocytes ont permis des premières études *in vitro* des interactions *B. ostreae* et hémocytes (Mourton et al., 1992). Le développement d'animaux résistants (Naciri Graven et al., 1998) a ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes cellulaires de défense impliqués dans les phénomènes de sensibilité et de résistance (Cochennec, 2001).

Ainsi, la bonamiose représente un modèle intéressant d'étude des interactions hôtes bivalves/pathogènes de par la possibilité de purification du parasite, la reproduction de la maladie en laboratoire et l'existence de lignées d'huîtres plates résistantes à la maladie. La bonamiose représente également un modèle d'étude de parasitisme particulier du fait du double rôle joué par les hémocytes dans cette maladie. En effet, ils sont à la fois les cellules effectrices des mécanismes de défense et les cellules hôtes du parasite.

Malgré plusieurs décennies de recherche sur ce modèle, des questions restaient posées telles que celles relatives aux voies d'échappement du parasite et celles relatives aux mécanismes de résistance de l'hôte. Différents travaux de thèse et post doctorat ont été entrepris sur ce thème au Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins.

A. Des protocoles expérimentaux et des outils analytiques adaptés

1. Protocoles expérimentaux

Dans le cadre des travaux réalisés pour mieux comprendre les interactions huître plate-*Bonamia ostreae* nous avons été amenés à reprendre et parfois adapter des protocoles expérimentaux déjà développés pour reproduire l'infection à l'échelle cellulaire (Mourton et al., 1992) ou à l'échelle de l'huître (Hervio et al., 1995).

- **Pour les expériences d'infection *in vitro***, l'hémolymphe est prélevée dans le sinus veineux du muscle adducteur de l'huître après avoir réalisé un trou dans la coquille à l'aide d'une pince. Les éventuels débris de coquille ou tissu sont éliminés en filtrant l'hémolymphe (maille 60 μm). Après filtration, les suspensions sont maintenues sur glace pour éviter l'agrégation des hémocytes. Le nombre d'hémocytes est ensuite estimé sur cellule de Mallassez et la concentration cellulaire est ajustée à 5.10^5 cellules ml^{-1} . Les hémocytes sont ensuite incubés en présence de parasites purifiés au ratio souhaité (ex : 5 parasites pour 1 hémocyte) à 15 °C. Des cyto centrifugations (100 g, 4°C, 1 min) sont réalisées à l'issue des incubations de façon à déterminer le nombre d'hémocytes infectés et éventuellement le nombre moyen de parasites par cellule infectée. Ce protocole est décrit par (Morga et al., 2009a).

- **Pour les expériences d'infection par injection de parasites**, les huîtres sont anesthésiées dans un bain de chlorure de magnésium (MgCl_2 50 g l^{-1}) qui permet l'ouverture temporaire de la coquille par relâchement des fibres musculaires. Le muscle devient ainsi accessible pour une injection intramusculaire de la suspension parasitaire. En fonction des quantités disponibles de parasites purifiés, entre 0.25 et 1. 10^6 parasites dans 100 μl d'eau de mer filtré sont injectés par huître. Les huîtres injectées sont alors remises en eau dans des bacs d'expérience alimentés en eau de mer en continu et enrichie en phytoplancton. Les variations de température sont enregistrées afin de vérifier l'absence de différence entre les bacs testés.

- **Le protocole d'infection expérimentale par cohabitation** est bien décrit par Lallias et al. (2009) qui par ailleurs fait une revue de l'ensemble des protocoles expérimentaux d'infection. L'approche expérimentale consiste à mettre en contact les huîtres à tester avec des huîtres provenant d'une région infectée par le parasite et injectées avec du parasite purifié. Comme décrit ci-dessus, après anesthésie, les huîtres sont injectées au niveau du muscle adducteur avec $1 \cdot 10^6$ parasites dans 100 μ l d'eau de mer filtrée. Les huîtres à tester (N) sont maintenues en contact avec N/2 huîtres provenant d'une région infectée. En fonction de la disponibilité en parasites, N/2 à N/3 huîtres utilisées comme source de *Bonamia ostreae* sont injectées avec la suspension parasitaire. Les huîtres à tester sont placées dans les mêmes bacs que les huîtres « source » et sont maintenues dans les conditions décrites ci-dessus.

Ces protocoles d'infection par injection et cohabitation permettent de reproduire la maladie au laboratoire et d'observer des mortalités dès deux mois post-injection ou entre 4 et 5 mois après la mise en contact avec les huîtres « source » de parasites (voir revue dans Lallias et al. 2009). Cependant, la dynamique de développement de l'infection varie d'une expérience à une autre en fonction de la nature des huîtres testées et également de la période de démarrage de l'infection. Il semble en effet qu'un démarrage plus tardif dans l'année de la mise en contact des huîtres infectées avec les huîtres à tester ralentisse le développement de l'infection dans ces dernières (Harrang, 2012). Nous ne disposons donc pas à l'heure actuelle de protocole expérimental d'infection standardisé et reproductible. Néanmoins, ces approches nous permettent d'évaluer la réponse de l'huître à une infection expérimentale et d'identifier les traits les plus robustes d'une expérience à une autre. Les réponses observées dans le cadre des infections *in vitro* (à l'échelle hémocytaire) apparaissent souvent plus contrastées que dans le cadre des infections *in vivo* mais elles ne reflètent pas la complexité des interactions qui peuvent exister chez ces animaux. Elles nous permettent d'identifier certains mécanismes impliqués dans la résistance ou la sensibilité à l'infection, ces résultats étant confirmés ou nuancés par ceux obtenus dans le cadre des infections *in vivo*.

2. Des outils moléculaires

Hybridation Suppressive Soustractive (HSS)

Considérant la faible quantité de données disponibles sur le génome de l'huître plate, il a été entrepris dans un premier temps de construire des banques soustractives suppressives afin d'identifier les bases moléculaires des interactions hôte/parasite.

La réalisation de ces banques d'ADNc a permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés entre :

(1) des hémocytes infectés dans le contexte d'une mise en contact *in vitro* et des hémocytes sains et

(2) des hémocytes d'huîtres plates sélectionnées pour leur résistance à la bonamiose et des hémocytes d'huîtres sauvages dans les deux cas expérimentalement infectés.

Ce travail a permis l'obtention de nombreuses séquences, et, finalement après analyse comparative avec les banques de données publiques, il a été possible d'identifier des gènes associés à des fonctions biologiques putatives chez l'huître plate.

Le Tableau 6 présente les caractéristiques générales des banques soustractives réalisées au LGPMM sur l'huître plate dans le cadre de la thèse de Benjamin Morga (Morga, 2010). Il indique le nombre d'ESTs uniques identifiées à partir de ces deux approches (1 et 2).

	(1)	(2)
Nombre de clones après soustraction	2448	
Nombre de clones séquencés	864	1920
Séquences analysées	809	1831
Nombre de séquences avec homologie significative	226	382
Nombre de contigs	330	333
Nombre de singletons	274	606
Redondance	40%	48%
Taille moyenne (paires de bases)	402	450

Tableau 6. Description des caractéristiques des hybridations soustractives suppressives réalisées (1) entre hémocytes infectés avec des parasites vivants et des parasites inactivés (2) entre hémocytes provenant d’huîtres sélectionnées et non sélectionnées mis en contact avec du parasite *Bonamia ostreae*

Certaines ESTs présentaient des fortes homologies dans les banques de données publiques avec des gènes codant des protéines notamment impliquées dans le cytosquelette, la chaîne respiratoire, la détoxification, des récepteurs membranaires, et le système immunitaire (Morga et al., 2012, 2011).

Cette première étape a ainsi permis d’identifier un nombre conséquent de gènes potentiellement impliqués dans la réponse de l’hémocyte à l’infection par *Bonamia ostreae* et dans les mécanismes de résistance de l’huître à la bonamiose.

[Des gènes de ménage pour une étude transcriptomique](#)

Pour pouvoir aller plus loin dans l’étude transcriptomique des interactions entre huître plate et parasite, il a été nécessaire d’identifier des gènes dit « gènes de ménage ». Il s’agit de

contrôles internes permettant de normaliser la mesure de l'expression relative des gènes étudiés. L'expression d'un bon gène de ménage doit être stable dans les différentes conditions de l'étude (Bustin et al., 2009).

L'analyse des banques soustractives obtenues a permis de sélectionner cinq ESTs candidates correspondant à des gènes utilisés dans d'autres modèles comme « gènes de ménage » : le facteur d'élongation 1 alpha (EF1- α), la protéine ribosomique L5, la glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la polyubiquitine (Ubiq) et la β -actine. La stabilité de l'expression de ces ESTs a été étudiée dans le cadre d'essais d'infection *in vitro* et mesurée par deux approches analytiques, *GeNorm* et *NormFinder*.

Nous avons ainsi identifié deux gènes dont l'expression est stable et comparable entre hémocytes en présence du parasite et hémocytes seuls : le facteur d'élongation alpha (EF1- α) et la glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase GAPDH (Morga et al., 2010).

L'évaluation de la stabilité des gènes de ménage est une étape essentielle dans la mise au point d'une PCR en temps réel pour mesurer l'expression relative de gènes d'intérêt. L'expression de gènes chez les mollusques bivalves est largement étudiée de nos jours, mais avant ces travaux seulement deux études intégrant la mise au point de l'utilisation de gènes de ménage avaient été réalisées chez *Mya arenaria* (Araya et al., 2008; Siah et al., 2008). Depuis, de nombreux articles rapportent l'identification et la validation de gènes de référence chez les mollusques marins (e.g. Butet et al., 2014; Du et al., 2013; Mauriz et al., 2012).

Caractérisation de gènes d'huître plate d'intérêt

Du fait de leur implication potentielle dans le système immunitaire de l'hôte, certaines ESTs ont fait l'objet de travaux complémentaires. Le cadre de lecture complet des gènes correspondants a été obtenu par une approche d'amplification rapide d'extrémités d'ADNc (RACE PCR). Cette approche consiste (1) à synthétiser les brins d'ADNc par la transcriptase inverse en utilisant comme amorce (= adaptateur) un oligonucléotide dessiné pour s'hybrider sur l'extrémité poly-A de l'ARNm (2) à amplifier par PCR puis à séquencer un

fragment d'ADNc en utilisant comme amorces l'adaptateur et une séquence spécifique du gène à caractériser.

L'analyse des séquences complètes de ces gènes permet de les comparer de façon plus robuste avec des séquences homologues chez d'autres espèces d'invertébrés et chez des vertébrés. L'analyse structurale des protéines codées par ces gènes permet de préciser leur fonction potentielle. Enfin, ces informations permettent d'envisager la production de protéines recombinantes et d'anticorps afin d'évaluer expérimentalement l'implication de ces protéines dans les interactions avec le parasite *Bonamia ostreae*.

Deux exemples de gènes dont le cadre de lecture a été complètement caractérisé sont présentés ci-dessous. Ces gènes ont fait ou doivent faire l'objet d'approches fonctionnelles afin de mieux comprendre les relations hémocyte/parasite : le gène codant la galectine et celui codant le Fas ligand.

-Oe Gal

Les galectines sont des glycoprotéines intervenant dans différents processus biologiques. Elles sont capables de se lier aux glycanes présents à la surface des micro-organismes et de favoriser l'entrée des organismes pathogènes dans les cellules. Une large gamme de galectines a été décrite chez les mammifères. Le cadre de lecture du gène codant la galectine chez l'huître plate, appelée Oe – Gal comporte 1103 nucléotides (nt) codant 335 codons. Il est précédé par une courte séquence (95 nt) non traduite en 5' et finit par une séquence de 200 nt avec un signal de polyadénylation en 3'. L'analyse de la séquence en amino acides révèle la présence de deux domaines homologues de reconnaissance carbohydrate (Figure 38). Au sein de chaque domaine homologue de reconnaissance carbohydrate, il est possible d'identifier 8 acides aminés très conservés chez les galectines de type « en tandem », impliqués dans la liaison avec le galactosyl.

Cette organisation est caractéristique des galectines « en tandem » telles que les galectines de type 4 des mammifères ou celles décrites chez les mollusques *Biomphalaria gabralata* et *Pinctada fucata* (Wang et al., 2011; Yoshino et al., 2008).

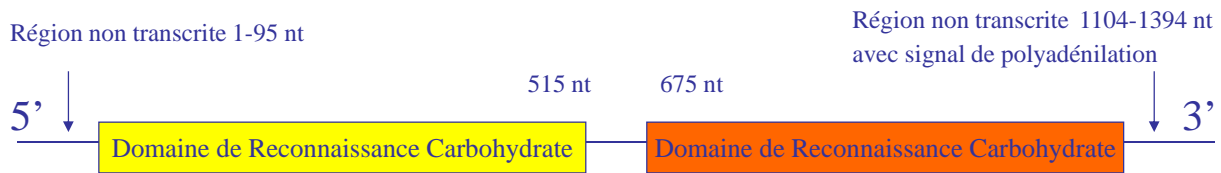


Figure 38. Structure d'Oe Gal (Morga et al., 2011)

- Oe Fas ligand

Fas ligand joue un rôle clé dans le processus d'apoptose (Opferman and Korsmeyer, 2003). En effet, Fas est une glycoprotéine transmembranaire dont le ligand, Fas-ligand induit l'apoptose une fois lié à Fas (Curtin and Cotter, 2003). Le cadre de lecture du gène identifié et caractérisé chez *Ostrea edulis*, appelé Oe Fas-Ligand, comporte 863 nt codants 287 codons. L'analyse de la séquence en amino acide révèle la présence d'un peptide signal, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine TNF (Tumor necrosis factor). De plus, trois sites de glycosylations ont pu être identifiés.

L'analyse phylogénétique réalisée à partir de séquences disponibles sous GenBank confirme l'appartenance de ce gène au groupe des gènes codant Fas-ligand et présente une forte identité avec un gène homologue décrit chez l'ormeau *Haliotis discus discus* (De Zoysa et al., 2009).

3. Des outils cellulaires

La cytométrie en flux est un outil d'intérêt pour l'étude des activités cellulaires. Afin de mettre au point les mesures de certaines activités hématocytaires de l'huître plate en réponse au parasite *Bonamia ostreae*, des expériences de mise en contact entre hémocytes et parasites vivants et inactivés à la chaleur ont été réalisées. Les activités hématocytaires mesurées en cytométrie en flux étaient la mortalité cellulaire, les activités estérases non spécifiques, la production d'espèces oxygénées réactives (EORs) et l'activité phagocytaire.

Par ailleurs, les hémocytes exposés au parasite ont également été observés au microscope photonique après cytocentrifugation.

Ces expériences réalisées en présence de deux concentrations de parasites (1 hémocyte pour 5 ou 10 parasites) ont permis d'apprécier la réponse spécifique des hémocytes à *Bonamia ostreae* après 2 heures d'exposition mais aussi de mettre au point des outils pour l'étude des activités hémocytaires dans le contexte d'études *in vitro* et *in vivo* des interactions hémocytes/parasites.

Les parasites vivants comme morts sont internalisés par les hémocytes mais n'induisent pas de mortalité de ces cellules. Les activités estérases non spécifiques et la production d'EORs apparaissent réduites en présence de parasites vivants comme morts. Cette modification est significativement plus importante pour les hémocytes en présence de parasites vivants au ratio testé le plus élevé (1 hémocyte pour 10 parasites).

Ces résultats démontrent l'intérêt de la cytométrie en flux et des mises au point réalisées pour l'étude cellulaire de la réponse à *Bonamia ostreae* et suggèrent que le parasite a la capacité de réduire les activités hémocytaires impliquées dans sa propre dégradation (Morga et al., 2009a).

Ces travaux ont permis d'augmenter significativement le nombre de séquences disponibles pour l'huître plate *Ostrea edulis*, une espèce peu représentée dans les banques de séquences publiques. La caractérisation de gènes d'intérêt, l'identification de gènes de « ménage » nous a permis d'envisager une étude transcriptomique des interactions huître plate et *Bonamia ostreae* que nous avons souhaité associer à une approche en cytométrie en flux. Ces travaux étaient donc un préalable indispensable pour étudier la réponse de l'huître plate à la bonamiose et pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance à cette maladie.

B. Interactions à l'échelle de la cellule

1. Etude cinétique de la réponse à *Bonamia ostreae*

Les outils de PCR en temps réel et de cytométrie en flux mis au point ont permis d'étudier la réponse des hémocytes au parasite *Bonamia ostreae in vitro* au cours du temps (Morga et al., 2011, 2009b).

L'observation en microscopie photonique des cellules centrifugées met en évidence une multiplication du parasite dans les hémocytes d'huître plates (Figure 39). Le nombre moyen de parasites par hémocyte infecté augmente en effet au cours du temps avec un pic à deux heures de contact. Le nombre de parasites binucléés observés tend également à augmenter au cours du temps.

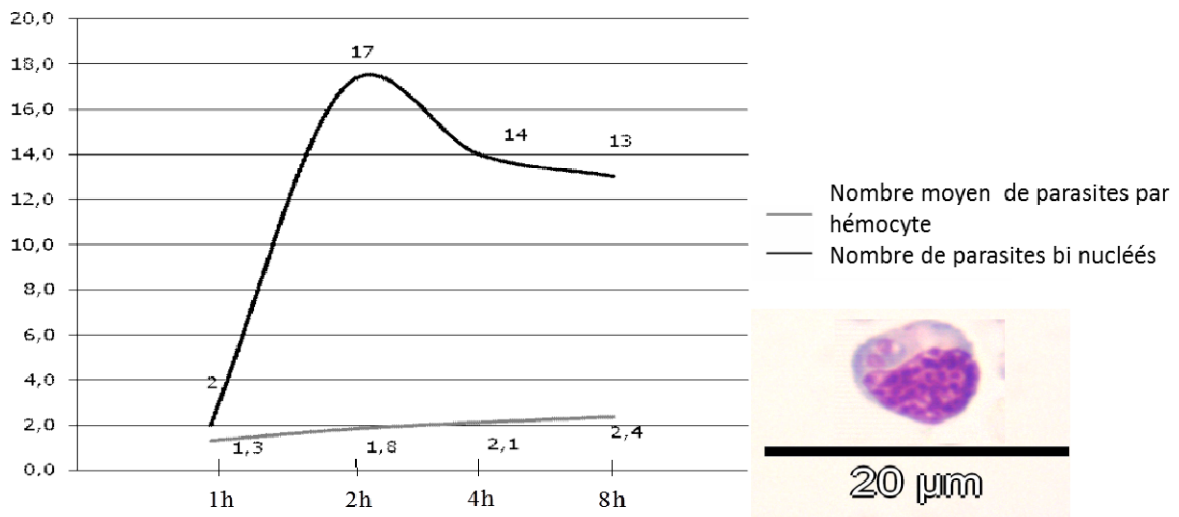


Figure 39. Suivi du nombre moyen de parasites *Bonamia ostreae* par hémocyte infecté et de parasites binucléés dans les hémocytes au cours d'une mise en contact entre hémocytes et parasites purifiés en fonction du temps (d'après Morga, 2010).

Les analyses en cytométrie en flux montrent une diminution de la production d'EORs et des estérases non spécifiques après 1h, 2h et 4h d'infection. Les estérases sont notamment

impliquées dans la dégradation des particules internalisées. La présence d'enzymes chez *Bonamia ostreae*, capables d'inhiber la production d'enzymes hydrolytiques telles que les estérases, pourrait expliquer la diminution de la détection de ces dernières et traduire un mécanisme par lequel le parasite échappe à la dégradation. De plus, la diminution de la production d'EORs chez les hémocytes infectés laisse suspecter une participation active du parasite afin de se protéger contre les EORs produites par les hémocytes. De tels mécanismes ont été rapportés chez d'autres parasites intracellulaires tels que *Trypanosoma* sp. (Penketh et al., 1987), *Toxoplasma* sp. (Murray et al., 1980; Shrestha et al., 2006) et *Perkinsus marinus* (Volety and Chu, 1997). Des activités de type phosphatases acides, connues pour inactiver la production de NADP(H) oxydase, ont été décrites chez le parasite *Bonamia ostreae* et pourraient être responsables de la diminution observée de production des EORs (Hervio et al., 1991). Ces résultats confirment donc la capacité du parasite à inhiber les mécanismes de dégradation mis en jeu par les hémocytes. Une diminution de l'activité phagocytaire a également été observée après deux heures d'infection. Cette diminution pourrait être due à la multiplication du parasite à l'intérieur des hémocytes.

Le suivi de l'expression d'Oe Gal suggère la probable implication de cette lectine dans la reconnaissance du parasite qui faciliterait son internalisation. La galectine est effectivement surexprimée dès le début de l'infection. De plus, l'activation de cette lectine est associée à une augmentation des transcrits du gène codant pour la filamine, l'implication de cette molécule dans le cytosquelette laisse suspecter une implication du cytosquelette de l'hôte dans l'internalisation du parasite. Une précédente étude réalisée par Chagot et al. (1992) avait permis de montrer une diminution du nombre de parasites internalisés suite à un traitement des hémocytes par la cytochalasine B. La cytochalasine B possède des propriétés inhibitrices sur le cytosquelette. La participation du cytosquelette de l'hôte dans l'internalisation de parasites intracellulaires a également été démontrée chez *Toxoplasma gondii* (Gonzalez et al., 2009).

Deux gènes codant des Super Oxyde Dismutases (SOD), l'une cytoplasmique et l'autre extracellulaire, ont été identifiés permettant l'étude de leur expression au cours du temps. Une sous-expression de la SOD extracellulaire a été observée ainsi qu'une légère surexpression de la SOD cytoplasmique après 2 et 4 heures. Les enzymes de type SOD permettent la dismutation des ions O_2^- en H_2O_2 . Les ions O_2^- sont les premières EORs

produites au cours de la flambée oxydative et sont des radicaux très toxiques que l'organisme doit rapidement éliminer pour éviter la destruction des membranes de ses propres cellules. Les SOD sont impliquées dans la cascade de transformation des ions O₂⁻ et permettent ainsi de protéger les cellules. Une surexpression des transcrits de gènes codant pour des SOD peut donc être interprétée comme une réponse à une induction de la flambée oxydative, alors qu'une inhibition pourrait induire des effets délétères pour les huîtres elles-mêmes. Le parasite pourrait être capable d'inhiber la production d'EOR, mais également la transcription de gènes codant des SOD. Cependant la sur-expression de la SOD cytoplasmique pourrait correspondre à une réponse normale suite à une augmentation des EOR induites par la pénétration du parasite dans les cellules.

D'autres gènes codant des protéines impliquées dans la dégradation des microorganismes ou dans des mécanismes de détoxification cellulaire présentaient une surexpression dans les hémocytes en présence du parasite suggérant que ces protéines sont impliquées dans les mécanismes développés par l'huître plate pour se défendre au niveau cellulaire face à la bonamiose : omega glutathione S-transferase (OGST), cytochrome P450, lysozyme, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), interferon regulatory factor (IRF).

Ces résultats mettent bien en évidence le « duel » qui se met en place entre (Figure 40)

- l'hémocyte d'une part qui « tente » d'internaliser (augmentation expression Oe-Gal ; phagocytose) et de dégrader (augmentation expression lysosyme, Cytochrome p450, TIMP, IRF) le parasite et de détoxifier l'environnement intra cytoplasmique (augmentation expression SOD et OGST)

et

- le parasite d'autre part qui « tente » de se faire internaliser (augmentation expression Oe-Gal ; phagocytose), de survivre (diminution production d'EORs, d'estérases non spécifiques et expression de la SOD extracellulaire) et de se multiplier (augmentation du nombre moyen de parasites par hémocyte infecté et du nombre de cellules parasitaires bi nucléées).

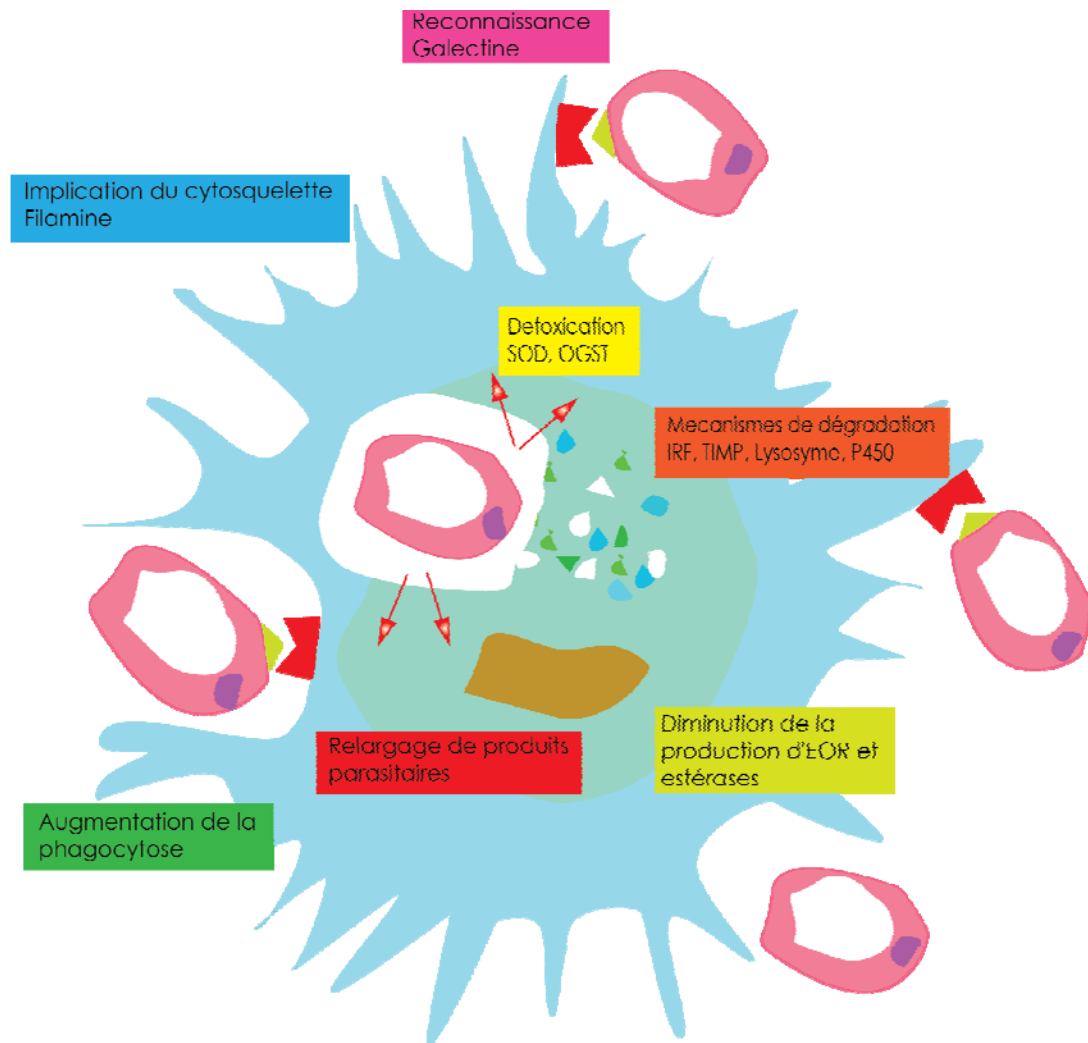


Figure 40. Schéma récapitulatif des interactions hôte/parasite observées dans les hémocytes d'*Ostrea edulis* entre 1h et 4h de mise en contact avec le parasite *Bonamia ostreae* (d'après Morga, 2010)

2. La galectine : une porte d'entrée pour le parasite ?

Nous avons précédemment présenté la structure du gène codant Oe-Gal, une galectine dite en tandem sur-exprimée chez les hémocytes en contact avec des parasites vivants. Le rôle de cette galectine dans l'infection a été étudié expérimentalement *in vitro* dans le cadre de mises en contact entre hémocytes et parasites purifiés.

Au préalable, la séquence du cadre de lecture a permis de commander auprès de la société GenScript la fabrication d'une protéine recombinante et la production d'anticorps polyclonaux de lapin.

Ceux-ci ont été utilisés dans nos infections expérimentales *in vitro* afin d'évaluer l'implication de la galectine dans l'internalisation du parasite dans les hémocytes.

Différentes conditions ont été testées :

-les parasites ont été exposés à des concentrations croissantes (0.1, 1, 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$) de protéines recombinantes, Rec-Oe Gal, pendant 30 minutes à température ambiante (TA) puis mis en contact avec des hémocytes 1 heure à TA à un ratio de 1 hémocyte pour 5 parasites ;

-les hémocytes ont été exposés à des concentrations croissantes d'anticorps Anti-OeGal (10, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$) pendant 30 minutes à TA puis mis en contact avec des parasites à un ratio de 1 :5 pendant 1 heure à TA.

-enfin les hémocytes ont été exposés à trois sucres (glucose, galactose, β -lactose) pendant 30 minutes avant d'être mis en contact avec le parasite dans les mêmes conditions que précédemment décrites.

Après une heure de contact entre hémocytes et parasites, les suspensions cellulaires ont été cyto-centrifugées, colorées puis observées au microscope afin de déterminer le nombre d'hémocytes ayant internalisé au moins un parasite (H_i). Un index a été établi en rapportant H_i dans les conditions testées à H_i en conditions « classiques » (hémocytes et parasites non traités).

Les résultats indiquent une augmentation de l'index lorsque les parasites ont été préalablement exposés à Rec-OeGal mais cette augmentation est significative uniquement pour la plus forte des concentrations testées (100 $\mu\text{g/ml}$) (Prado-Alvarez et al., 2013b ;Figure 41a).

L'exposition préalable des hémocytes aux anticorps Anti-OeGal tend à diminuer l'index calculé, cette tendance étant significative pour les concentrations 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 41b). Enfin, l'exposition des hémocytes aux sucres testés induit une diminution de l'index de façon significative (Figure 41b).

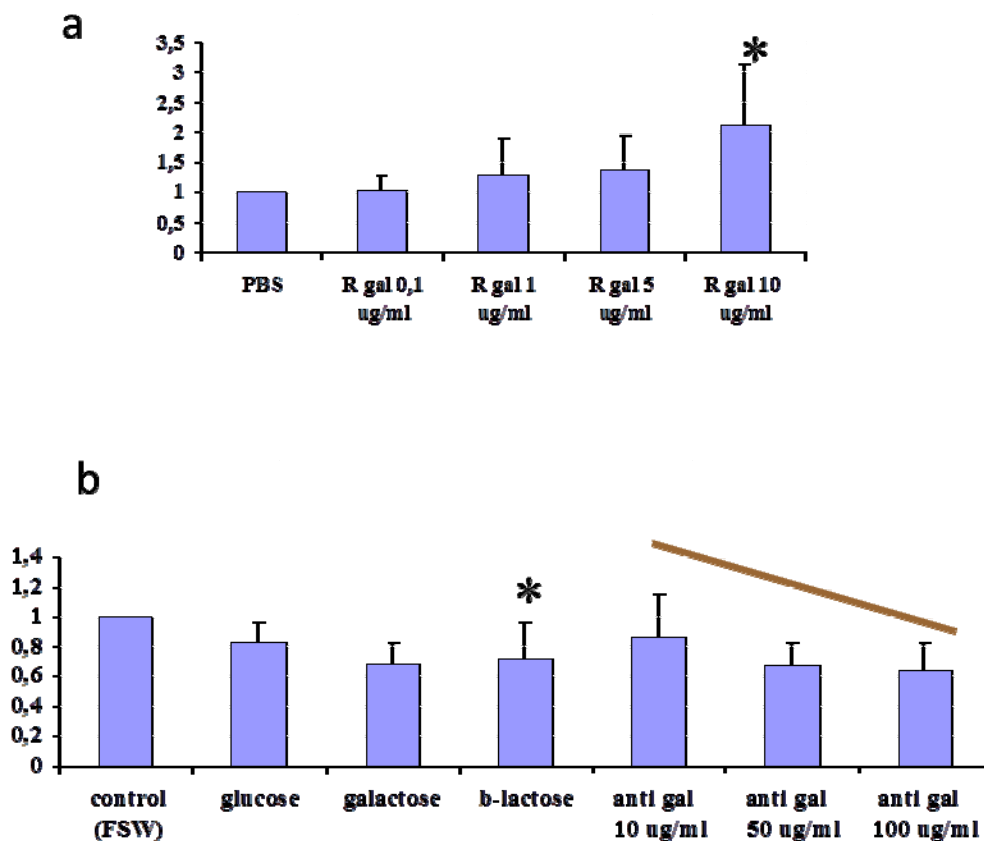


Figure 41. Implication de la galectine dans l'internalisation du parasite *Bonamia ostreae* dans les hémocytes. Un index est établi en rapportant le nombre d'hémocytes ayant internalisé au moins un parasite après traitement / à ce même nombre en l'absence de traitement. A) les parasites ont été préalablement exposés à des concentrations croissantes de protéines recombinantes (R. gal). B) les hémocytes ont été préalablement exposés à différents sucres ou concentrations croissantes d'anticorps (anti-gal).

Ainsi nos résultats suggèrent une participation de la protéine à la reconnaissance et l'internalisation du parasite dans les hémocytes. En effet, l'incubation des parasites avec la protéine recombinante augmente le nombre d'hémocytes ayant internalisé *Bonamia ostreae*. Au contraire, la pré-exposition des hémocytes aux anticorps ou à des sucres ayant la capacité de se lier à la galectine, induit une diminution de l'internalisation du parasite. Cependant, l'observation de parasites dans les hémocytes même après traitement préalable de ceux-ci indique qu'Oe-Gal n'est pas la seule porte d'entrée pour le parasite.

Ces travaux ont été complétés par une étude de l'expression du gène Oe-Gal dans différents tissus d'huîtres plates en relation avec la charge parasitaire. A cet effet, un échantillon de 50

huitres plates de la Baie Quiberon a été prélevé et traité de façon à extraire les ARN et ADN à partir de six organes : branchies, manteau, glande digestive, palpes labiaux, gonade et muscle adducteur.

La détection et quantification du parasite ont été réalisées en utilisant la PCR en temps réel précédemment développée et présentée (Robert et al., 2009).

L'expression d'Oe Gal en prenant comme gène de référence EF1 α ne présente pas de différence significative entre les différents tissus testés. En revanche, l'expression relative de Oe-Gal dans les échantillons détectés positifs en PCR par rapport aux échantillons négatifs (= calibrateur) met en évidence une surexpression de ce gène dans tous les tissus à l'exception de la gonade (Figure 42). De plus, une corrélation significative ($p= 0,0008$) a été trouvée entre l'expression de Oe-Gal et la charge parasitaire dans les branchies.

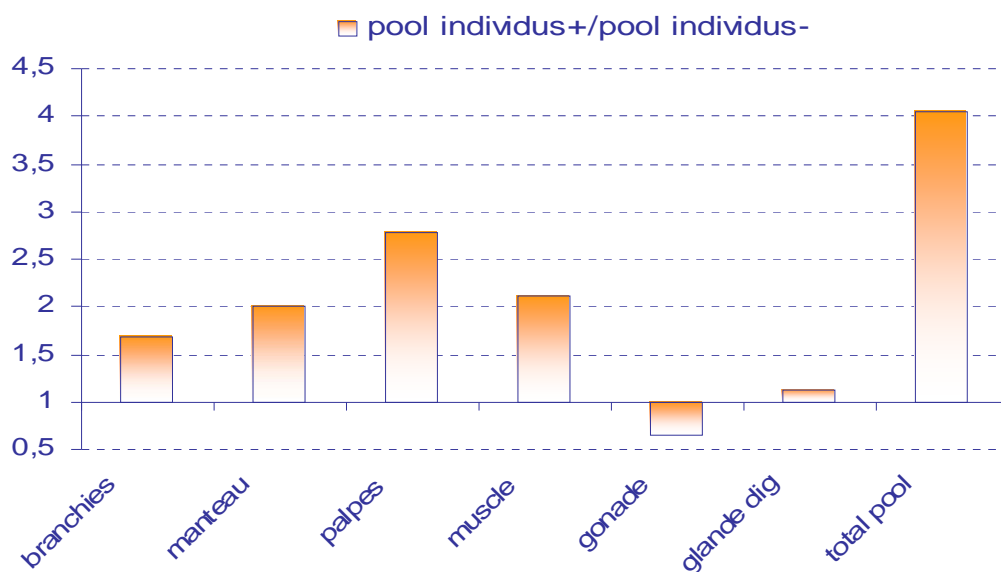


Figure 42. Expression relative de Oe-Gal dans des pools des différents organes d'huître en fonction de leur statut infecté versus non infecté (= calibrateur)

Les résultats obtenus à partir d'huîtres naturellement infectées confirment l'implication de la galectine dans la réponse de l'huître à la bonamiose et plus particulièrement dans l'internalisation du parasite dans les hémocytes. Ainsi, nos résultats supportent les conclusions d'auteurs ayant démontré que les galectines ne se lient pas uniquement à des glycans endogènes mais également à des glycans présents à la surface de micro-organismes

potentiellement pathogènes. Les galectines jouent donc un rôle dans la reconnaissance puis l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte (Sato and Nieminen, 2004).

La surexpression du gène *Oe Gal* n'est observée qu'en présence de parasites vivants et pas en présence de parasites inactivés. Cette observation laisse penser que le parasite active sa propre reconnaissance puis son internalisation par les hémocytes.

Des résultats analogues ont été obtenus chez *Crassostrea virginica*, espèce chez laquelle une galectine a également été caractérisée et dont l'expression semble activée en présence du parasite *Perkinsus marinus* (Tasumi and Vasta, 2007). Ces auteurs se sont également intéressés à la spécificité de la galectine pour le parasite en comparant le « taux d'internalisation » de *P. marinus* avec celui d'algues phytoplanctoniques.

Il serait intéressant de pouvoir tester également la spécificité d'*Oe Gal* vis-à-vis de *Bonamia ostreae* en comparant l'internalisation du parasite avec celle d'autres organismes pathogènes ou micro algues.

C. *Etre résistant à la bonamiose, ça veut dire quoi ?*

Depuis l'émergence de la bonamiose, plusieurs études ont été menées à travers l'Europe afin de mieux comprendre l'étiologie de cette épizootie et d'essayer de relancer la culture de l'huître plate *Ostrea edulis*. Malgré la surexploitation et les épizooties successives, l'huître plate semble se maintenir sur nos côtes de façon localisée, laissant penser à des phénomènes d'adaptation locale de l'huître vis-à-vis de son environnement biotique (proie, prédateurs, parasites) et abiotique (substrat, salinité, température, ...). La confirmation du caractère héritable de la résistance à la bonamiose et le fait que ce caractère héritable soit compatible avec de bonnes performances de croissance renforcent l'intérêt des programmes de sélection pour la profession. Des travaux d'amélioration génétique ont été entrepris chez *O. edulis* afin d'obtenir des animaux résistants à *Bonamia ostreae* dans différents pays européens comme en Espagne, en Irlande et en France. Le programme de sélection suivi par l'Ifremer depuis 1985 a reposé sur une pression de sélection par infection expérimentale (Hervio, 1992). Après plusieurs générations et années de sélection massale, le taux de survie dans les huîtres sélectionnées est apparu supérieur à celui des huîtres non sélectionnées (Naciri Graven et al., 1998). De plus la prévalence de *B. ostreae* apparaît corrélée aux taux de survie (Bédier, 2001) mettant en évidence que les huîtres sélectionnées ont la capacité de juguler le développement du parasite et de minimiser son impact.

Les huîtres sélectionnées constituent un matériel biologique de choix pour comprendre les mécanismes impliqués dans la sensibilité et la résistance des huîtres à la bonamiose.

Des études expérimentales comparant huîtres plates sélectionnées et non sélectionnées ont ainsi été réalisées à l'échelle de l'hémocyte puis à l'échelle des huîtres. Ces travaux ont été complétés par une étude de la composante génétique de cette résistance à la bonamiose. Mais cette section présente dans un premier temps les résultats de comparaisons réalisées sur le terrain et *in vitro* entre huître plate et huître creuse, *Crassostrea gigas* étant une espèce résistante à l'infection à *Bonamia ostreae*.

1. Huîtres plates/Huîtres creuses

Des études expérimentales par injection de parasites *Bonamia ostreae* ont montré que l'huître creuse *Crassostrea gigas* n'est pas sensible à la bonamiose (Culloty et al., 1999; Renault et al., 1995b). Cependant, plus récemment, des analyses réalisées en PCR sur des huîtres creuses issues de secteurs infectés ont révélé la présence d'ADN du parasite dans quelques huîtres suggérant que cette espèce pourrait agir comme vecteur ou réservoir de *B. ostreae* (Lynch et al., 2010).

Nous avons été amenés à comparer la réponse de l'huître plate *Ostrea edulis*, sensible à la bonamiose et celle de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le contexte d'études *in situ* et *in vitro* (Comesaña et al., 2012).

Des huîtres des deux espèces ont ainsi été déployées dans des secteurs connus pour être infectés par *Bonamia ostreae* : Tralee et Rossmore en Irlande et Ortega en Galice (Espagne). Après un séjour de 5 à 10 mois sur ces sites, les huîtres ont fait l'objet d'analyses en cyto-centrifugation et en PCR pour déterminer le statut des huîtres vis-à-vis de l'infection. La quantité totale et la nature des hémocytes ont été déterminées au microscope photonique en observant les cyto-centrifugations. Ces données ont été complétées par la mesure de la capacité de phagocytose des hémocytes, la production de super oxyde intra et extracellulaires, et, enfin, la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'oxyde nitrique (NO).

Dans cette approche, *Bonamia ostreae* n'a pas été détecté dans les huîtres creuses alors que jusqu'à 64% des huîtres plates ont pu être détectées positives en PCR. Le nombre total d'hémocytes était significativement plus important et présentait moins de variabilité dans *Crassostrea gigas* que dans *Ostrea edulis*. Il a été précédemment montré que ce paramètre dépendait de la présence d'organismes pathogènes dans les bivalves tels que l'huître américaine *C. virginica* infectée par *Perkinsus marinus* (Anderson et al., 1995; Chu and La Peyre, 1993) et par *Haplosporidium nelsoni* (Ford et al., 1993) ou la palourde japonaise *Venerupis (=Ruditapes) philippinarum* infectée par *Vibrio tapetis* (Allam and Ford, 2006 ; Oubella et al., 1993). Par ailleurs, une différence marquée a été observée entre les deux espèces concernant les types d'hémocytes comptés. En effet, *C. gigas* présentait un pourcentage de granulocytes significativement plus élevé qu'*O. edulis*. Cette différence

mériterait des travaux complémentaires afin de vérifier si ce paramètre est lié à l'apparente résistance de *C. gigas* vis-à-vis de *B. ostreae*. Les autres paramètres mesurés n'ont pas présenté de différences entre les deux espèces d'huîtres.

Cette étude *in situ* a été complétée par une expérience *in vitro* consistant à mettre en contact des hémocytes des deux espèces d'huîtres en présence de parasites purifiés à différents ratios (1 hémocyte pour 5 et 10 parasites). La flambée oxydative a été appréciée en mesurant la production d'espèces oxygénées réactives (EORs). Le parasite induit une diminution de la production d'EORs uniquement chez *Ostrea edulis* alors qu'elle reste inchangée chez *Crassostrea gigas*. Ainsi, l'interférence du parasite sur la flambée oxydative contribuerait à sa survie et sa multiplication au sein des hémocytes d'*O. edulis* alors que l'absence d'interférence pourrait en partie expliquer la résistance de l'huître creuse à la bonamiose.

2. Huîtres plates sensibles/Huîtres plates sélectionnées

La disponibilité en huîtres plates provenant du programme de sélection vis-à-vis de la bonamiose et produites à l'écloserie d'Ifrémer Argenton nous a permis d'envisager des études expérimentales *in vitro* et *in vivo*. Ne disposant pas d'huîtres non sélectionnées produites dans des conditions similaires en écloserie, nous nous sommes approvisionnés en huîtres plates sauvages provenant d'une zone connue pour être infectée par *Bonamia ostreae* : Quiberon (Morbihan). Dans la suite de cette partie, les huîtres sélectionnées sont appelées huîtres « résistantes » et les huîtres prélevées à Quiberon sont appelées huîtres « sensibles ».

Expériences in vitro

Les mécanismes cellulaires et moléculaires liés aux phénomènes de résistance et de sensibilité à la maladie ont été étudiés chez les deux groupes d'huîtres précédemment présentés: des huîtres plates « sensibles » et des huîtres plates « résistantes ».

La réalisation de banques d'ADNc a tout d'abord permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés en réponse à l'infection par le parasite *Bonamia ostreae* chez les

deux groupes, en particulier des gènes impliqués dans la détoxification (Oe-EcSOD) et dans l'immunité (Oe IAP, Oe Fas-ligand, cathepsine B, cyclophiline B et Oe C1q) (Morga et al., 2012).

L'analyse des niveaux d'expression de ces gènes par PCR en temps réel *in vitro* a montré une surexpression d'Oe EcSOD chez les hémocytes infectés d'huîtres plates « résistantes » suggérant une implication du mécanisme de dismutation des radicaux libres O₂-dans la résistance à la bonamiose en limitant les effets néfastes du parasite sur leurs propres cellules et tissus. La surexpression de gènes impliqués dans l'induction et l'inhibition de l'apoptose (Oe IAP, Oe Fas-ligand, cathepsine B) chez les hémocytes provenant d'huîtres résistantes mis en contact avec *Bonamia ostreae* souligne l'importance de ce mécanisme complexe qui permet d'éviter ou de limiter la dissémination des agents infectieux dans l'organisme. Ainsi, le déclenchement de la mort cellulaire programmée (sur expression Oe Fas-Ligand et cathepsine) pourrait constituer l'un des mécanismes impliqués dans la résistance à la bonamiose à condition qu'il soit régulé (sur expression Oe IAP) afin de limiter les conséquences négatives de l'apoptose pour l'organisme hôte. Il est également possible que la surexpression d'Oe IAP soit en partie activée par le parasite lui-même afin de limiter le phénomène d'apoptose et ainsi assurer sa survie dans les cellules infectées.

Expériences *in vivo* par injection et cohabitation

Des expériences d'infection par injection et par cohabitation ont été conduites sur les huîtres considérées comme « sensibles » et les huîtres considérées comme « résistantes ». Dans les deux cas, la réponse des deux groupes d'huîtres à l'infection expérimentale a été étudiée en utilisant les outils précédemment mis au point : PCR en temps réel et cytométrie en flux (Morga, 2010).

Dans la mesure où toutes les huîtres reçoivent une même dose de parasites ou d'eau de mer filtrée en même temps, l'expérience d'infection par injection offre la possibilité d'étudier l'évolution de l'infection et de la réponse des huîtres dans le temps (ici à 12h, 3, 5, 8, 15 et 30 jours). Elle ne permet cependant pas de considérer les interactions hôte-parasite dans leur ensemble et ne prend pas en compte les premières barrières de défense que sont le mucus et les épithéliums.

A l'inverse, les expériences de cohabitation entre huîtres testées et huîtres infectées permettent d'étudier la réponse de l'huître dans son ensemble. Mais dans ce cas, le relargage de parasites des huîtres sources n'est pas maîtrisé ni dans le temps ni en quantité. Dans le contexte des infections expérimentales par injection comme par cohabitation, les fréquences de détection du parasite par PCR étaient plus élevées chez les huîtres plates « sensibles » que chez les huîtres « résistantes » (ex cohabitation Figure 43). De plus, dans les expériences par cohabitation, des mortalités plus élevées ont été notées dans les huîtres non sélectionnées confirmant bien le caractère « résistant » des huîtres issues du programme de sélection (Figure 43).

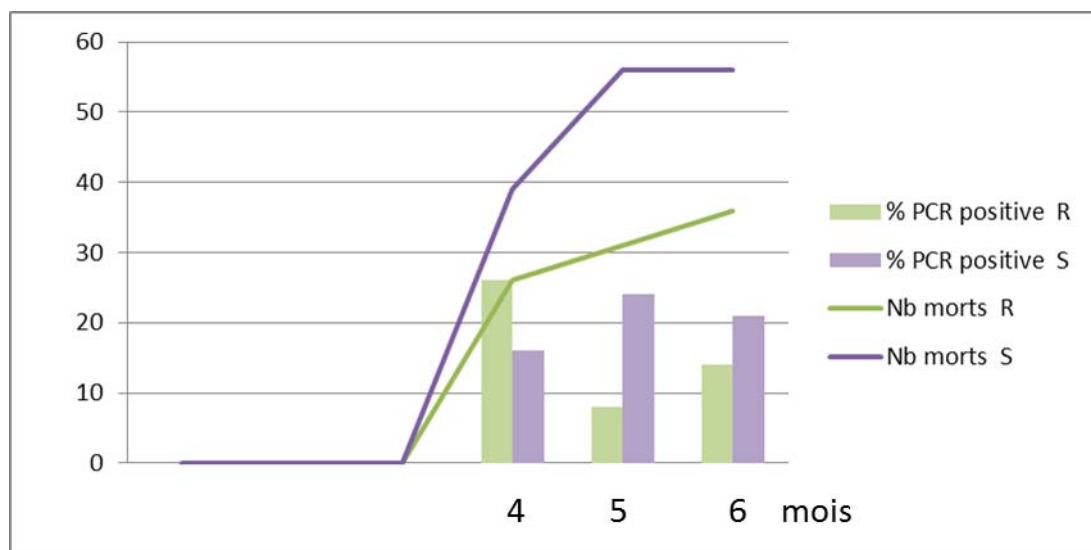


Figure 43. Mortalité (Nb d'animaux) et détection par PCR du parasite *Bonamia ostreae* (%) dans les huîtres sélectionnées (=R) et non sélectionnées (=S) dans le cadre de l'expérience de cohabitation.

Les huîtres « résistantes » semblent être positives en PCR plus rapidement que les huîtres « sensibles ». L'examen histologique des huîtres détectées positives en PCR a permis d'établir le niveau d'infection selon une échelle semi-quantitative (Figure 44). On peut ainsi noter que sur l'expérience de 6 mois, d'avantage d'huîtres « sensibles » présentent un niveau 2+ que les huîtres « résistantes ».

La moindre détection du parasite dans les huîtres « résistantes » associée à une meilleure survie que les huîtres « sensibles » traduit bien le caractère résistant de ces huîtres, à savoir des huîtres capables de juguler le développement de l'infection et de minimiser l'impact négatif du parasite.

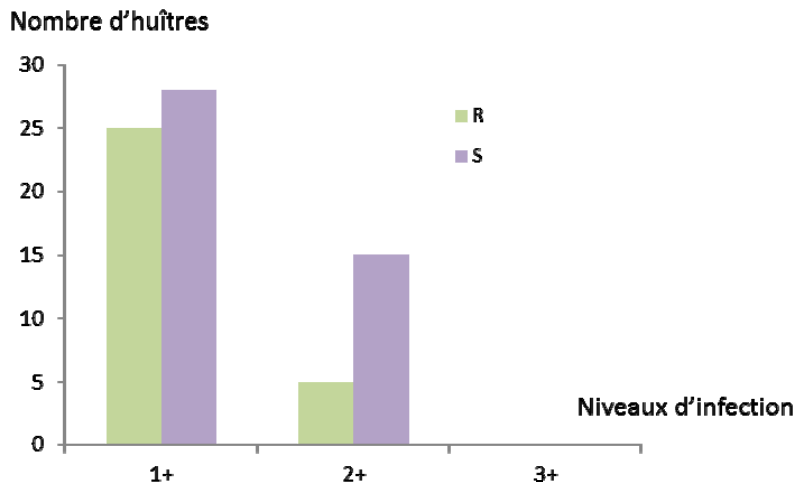


Figure 44. Niveau d'infection à *Bonamia ostreae* dans les huîtres plates sélectionnées (=R) et non sélectionnées (=S) détectées infectées par apposition de tissus cardiaques dans le cadre de l'expérience de cohabitation.

L'analyse des activités hématocytaires en cytométrie en flux dans le cadre de l'infection par injection a révélé une augmentation significative de production d'EORs chez les huîtres « sensibles » alors que les huîtres « résistantes » injectées par du parasite produisent moins d'EORs et présentent en général un niveau de phagocytose plus bas que le contrôle (= huîtres injectées eau de mer).

Des tendances identiques ont été observées pour les huîtres testées par cohabitation. Néanmoins, seule l'activité de phagocytose présente une différence significative entre les huîtres « résistantes » infectées et non infectées

L'expression relative de quatre gènes a été étudiée dans ces différentes conditions expérimentales : deux gènes impliqués dans la cascade de l'apoptose (Oe Fas ligand et Oe IAP) et deux gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification (SOD et Oe Ec-SOD).

Dans le contexte expérimental par injection, les huîtres « résistantes » présentent moins de variations significatives des niveaux d'expression des gènes ciblés dans le temps que les huîtres « sensibles » (Figure 45). Il est intéressant de noter une surexpression concomitante de Oe Fas Ligand et Oe IAP cinq jours post injection chez les huîtres « résistantes » injectées avec du parasite. Au contraire, ces mêmes gènes apparaissent sous exprimés au même

temps chez les huîtres « sensibles ». Une sous-expression d'Oe-EcSOD est observée dès cinq jours post injection dans les huîtres « résistantes » tandis que les huîtres « sensibles » tendent à présenter une surexpression de ce gène.

Dans le contexte expérimental par cohabitation, l'expression d'Oe IAP et d'Oe SOD ne présente pas de variation significative chez les huîtres infectées qu'elles soient « résistantes » ou « sensibles ». Oe Fas ligand apparaît significativement surexprimé dans les deux catégories d'huîtres suggérant que l'activation de l'apoptose est un mécanisme de défense de l'huître face au parasite (Figure 46). Enfin, de même que dans le cadre de l'expérience par injection, Oe Ec-SOD est significativement sous-exprimé dans les huîtres « résistantes » infectées. La moindre expression d'Oe Ec-SOD pourrait indiquer que le processus de régulation de la concentration extra cellulaire d'EORs et d'espèces azotées réactives (EAR) est moins actif chez les huîtres résistantes. Ces huîtres ont alors, peut-être, une capacité plus importante à dégrader le parasite aux abords de l'hémocyte.

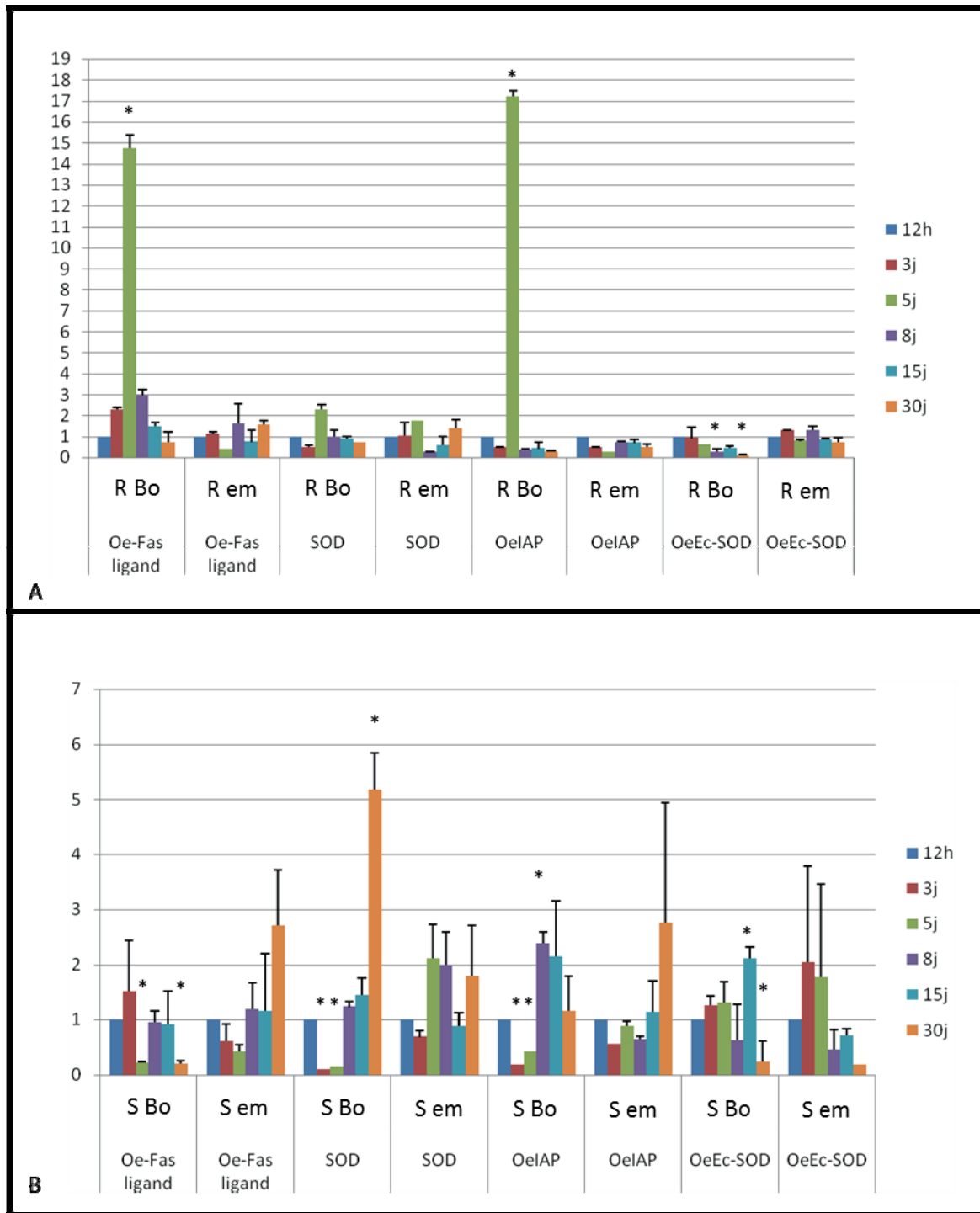


Figure 45. Expression relative d'Oe Fas ligand, Oe IAP, SOD et Oe Ec-SOD dans (A) les huîtres plates « résistantes » =R et (B) « sensibles » =S injectées avec du parasite (Bo) ou avec de l'eau de mer filtrée à 0.22µm (em); Normalisateur : EF1α, calibrateur : 12h. * indique une différence significative par rapport à 12h (Morga et al. en préparation).

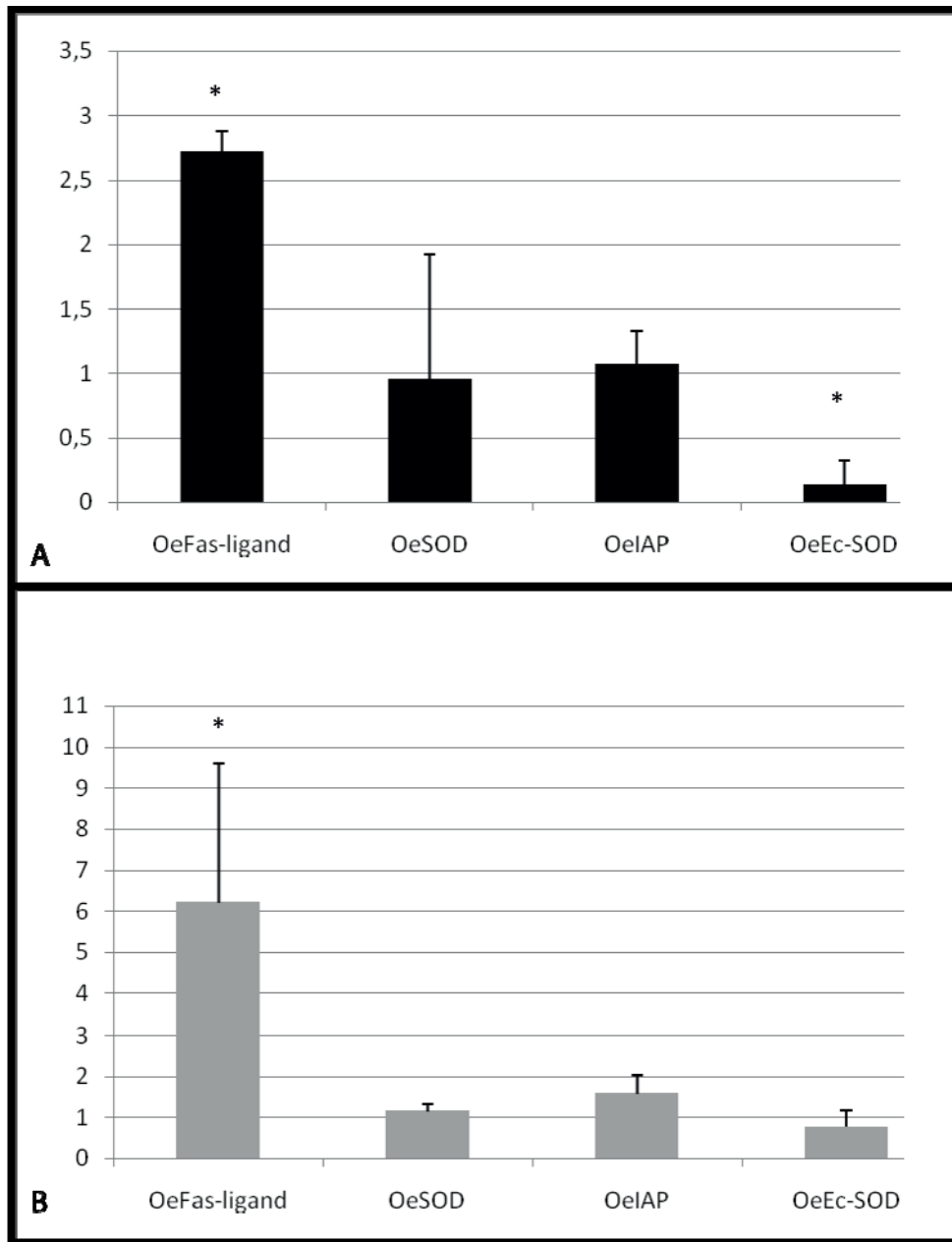


Figure 46. Expression relative d'Oe Fas ligand, Oe IAP, SOD et Oe Ec-SOD dans (A) les huîtres plates « résistantes » et (B) « sensibles » détectées infectées dans l'expérience de cohabitation. Normalisateur : EF1 α , calibrateur : huîtres détectées non infectées. * indique une différence significative par rapport aux huîtres non infectées (Morga et al. en préparation).

Les deux conditions expérimentales testées nous ont permis d'appréhender de façon globale la réponse à la bonamiose des huîtres « résistantes » et « sensibles ». Trois traits principaux associés à la résistance ressortent de ces travaux :

- une diminution de la phagocytose
- une moindre régulation de la concentration extra cellulaire d'EORs et d'EARs
- une capacité plus importante à moduler la cascade de l'apoptose

L'ensemble des données moléculaires acquises par les approches d'HSS et le développement d'outils moléculaires et cellulaires ont permis d'envisager de nouveaux travaux visant à mieux caractériser la résistance à la bonamiose.

3. Composante génétique de la résistance à la bonamiose

L'amélioration de la compréhension de la composante génétique de la résistance à la maladie a notamment été abordée dans le cadre de la thèse d'Estelle Harrang (Harrang, 2012). Les objectifs de ces travaux étaient de développer de nouveaux marqueurs moléculaires pour mieux caractériser la résistance à la bonamiose et de tester ces nouveaux outils pour améliorer notre compréhension de cette résistance.

Des marqueurs SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ont été développés à partir de différentes sources de données de séquences, parmi lesquelles les bibliothèques d'ESTs générées précédemment (voir V.A.2 Des outils moléculaires). Ces marqueurs, dits de type I, du fait de leur développement sur des gènes de fonction connue, sont intéressants pour les études de cartographie génétique de liaison et de cartographie QTL (Liu and Cordes, 2004). Dans cette approche, sur 114 séquences d'ESTs issues des bibliothèques de gènes candidats potentiellement impliqués dans la réponse de l'huître plate à la bonamiose, 40 séquences, soit 21,3 MB, ont pu être utilisées pour la recherche de SNPs. En fonction des fonctions biologiques putatives des gènes correspondants, ceux-ci peuvent être groupés en 8 catégories (Figure 47) :

- 1) Métabolisme cellulaire
- 2) Détoxification et protéines de stress
- 3) Communication cellulaire, récepteurs membranaires, système immunitaire
- 4) Protéines hypothétiques
- 5) Protéines ribosomales
- 6) Chaîne respiratoire
- 7) Cycle cellulaire, réparation de l'ADN, protéines de régulation et transcription,
- 8) Cytosquelette

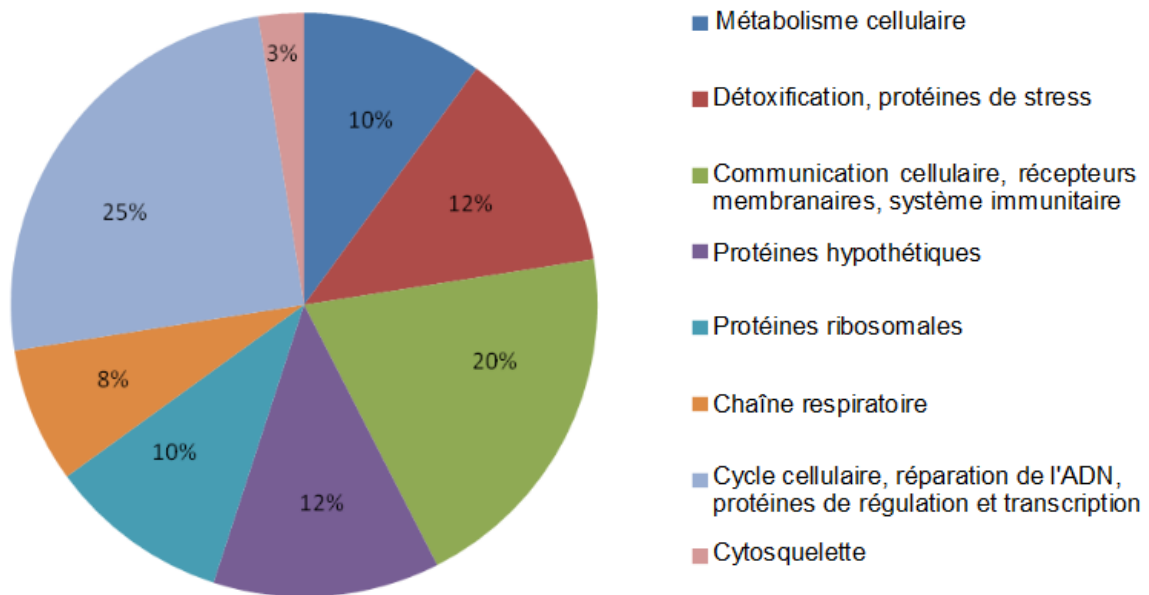


Figure 47. Distribution des séquences EST utilisées pour la caractérisation de SNP *in vitro* chez *Ostrea edulis* parmi huit grandes catégories fonctionnelles (Harrang, 2012).

Dans un premier temps 386 SNPs de type substitution (insertion et délétion non retenues) ont été identifiés sur ces 40 séquences. La distribution inégale des SNPs, en faveur des transitions en 3^{ème} position des codons, reflète l'apparition non aléatoire des mutations à travers le génome. Parmi les 386 SNPs, 73% correspondent à des mutations silencieuses.

Après une étape d'optimisation et de validation, seuls 40 SNPs ont été retenus pour leur intérêt pour le génotypage des familles ségrégeantes et des populations naturelles. Cette différence s'explique notamment par des amplifications non spécifiques, par la présence de polymorphisme au niveau des sites d'hybridation des amorces et par la présence d'introns de grande taille (médiane de 400 bases par séquence).

Ces marqueurs en complément d'autres SNPs, marqueurs microsatellites et AFLPs, ont permis la construction de dix groupes de liaisons, qui, une fois assemblés devient la carte de référence pour *Ostrea edulis*.

Les phénotypes de réponse à la maladie ont ainsi été caractérisés à l'aide des marqueurs moléculaires disponibles à différentes échelles à travers la réalisation d'infections expérimentales :

- 1- A l'échelle interfamiliale dans le contexte d'une expérience d'infection par cohabitation d'huîtres de familles différentes de même génération avec des huîtres infectées.
- 2- A l'échelle intra-familiale dans le contexte d'une expérience d'infection d'huîtres issues d'une même famille ségrégeante par injection de parasites purifiés.
- 3- A l'échelle inter-populationnelle dans le contexte d'une expérience d'infection d'huîtres de 3 populations différentes par injection de parasites purifiés ou d'eau de mer filtrée.

L'objectif de la première expérience était d'estimer la diversité des QTLs de réponses à une infection expérimentale par cohabitation à *Bonamia ostreae*, chez trois familles ségrégeantes. Aux termes de l'expérience, des QTLs significatifs et présumés ont été associés aux phénotypes « mort » et « vivant ». Certains de ces QTLs ont également pu être associés à la présence du parasite chez les morts et son absence chez les survivants. L'ensemble des QTLs identifiés se situe sur plusieurs groupes de liaison différents, confirmant ainsi le caractère polygénique de la résistance à la bonamiose précédemment identifié (Lallias et al., 2009). Certains QTLs ont été identifiés chez plusieurs familles et s'avèrent particulièrement prometteurs pour la mise en œuvre de programme de sélection assistée par marqueurs. Cependant, pour qu'un tel programme soit efficace, il est nécessaire d'affiner la localisation de ces QTLs et de détecter d'éventuels effets d'épistasie ou d'interférence avec d'autres fonctions biologiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, des outils de cytométrie en flux et de mesure d'expression de certains gènes ont été développés afin d'appréhender la réponse cellulaire et moléculaire de l'huître à la bonamiose. Dans ce contexte l'objectif de la deuxième étude était d'investiguer les réponses fonctionnelles d'une famille ségrégeante soumise à une injection de parasite à l'échelle des individus.

Les QTLs liés à l'expression de gènes d'intérêt sont appelés eQTLs (expression Quantitative Trait Loci) La cartographie eQTL permet ainsi d'associer le polymorphisme d'une région du génome à la variation du niveau d'expression d'un gène sélectionné. Cinq gènes

précédemment identifiés comme impliqués dans la réponse à la bonamiose (Morga et al., 2009b) ont été sélectionnés pour cette approche :

- Oe Gal impliqué dans l'internalisation du parasite ;
- Oe C1q et SOD impliqués dans la réponse à une infection et la détoxification ;
- Oe Fas ligand et Oe IAP impliqués dans la modulation de l'apoptose.

Cette approche gène candidat/cartographie a été complétée par la recherche de QTLs associés à certaines activités hématocytaires potentiellement influencées par la présence de *Bonamia ostreae* : la capacité de phagocytose et la production d'espèces oxygénées réactives (Morga et al., 2011).

Chaque paramètre (gènes et activités hématocytaires) étudié a été associé avec une à quatre régions génomiques dispersées sur un ou plusieurs groupements. La localisation multiple de QTLs/eQTLs associés à l'expression d'un même paramètre suggère un effet d'épistasie ou de multigénie additive de la part de différents loci. Ainsi, plusieurs régions du génome semblent impliquées dans la régulation de l'expression de C1q, de l'IAP, Fas Ligand et de la capacité de phagocytose. De façon intéressante, plusieurs eQTLs et QTLs ont été cartographiés sur les mêmes groupes de liaison (ex : Figure 48) avec parfois un recouvrement des intervalles de confiance. Ces résultats renforcent l'intérêt d'affiner l'étude de ces groupements au niveau de ces régions de co-localisation de QTLs/eQTLs .

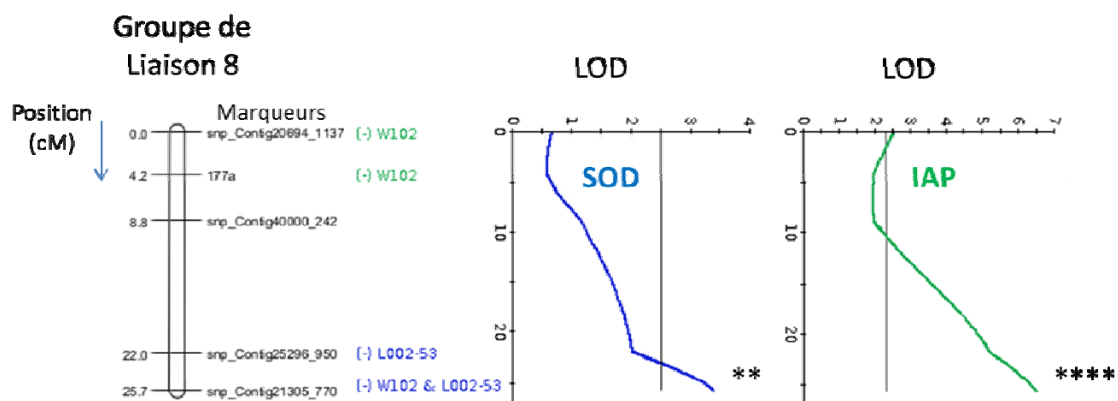


Figure 48. Exemple de distribution des « LOD score » le long du groupe de liaison 8 regroupant les eQTLs significatifs cartographiés par la méthode de cartographie par intervalle. Les régions eQTLs correspondent aux valeurs maximales de LOD. Les lignes correspondent aux seuils de significativité. Le plus haut niveau de significativité des QTLs (eQTLs) est indiqué au niveau du LOD maximal (** : $P < 0,01$; **** : $P < 0,001$). Le score LOD (Logarithm of the Odd ratio, (Morton, 1955)) est estimé par un test de liaison entre groupes de liaison potentiels

La combinaison de l'approche fonctionnelle et de la cartographie a permis d'identifier des régions génomiques associées à la régulation des réponses moléculaires et cellulaires étudiées. Néanmoins, elle doit être complétée et affinée avant de pouvoir envisager l'utilisation de ces paramètres dans la mise en place d'un programme de sélection.

Enfin, après avoir étudié la variabilité intra famille des réponses fonctionnelles impliquées dans la réponse de l'huître à la bonamiose, il semblait intéressant d'étudier cette variation à l'échelle de populations naturelles génétiquement et écologiquement distinctes. Pour cela, trois populations d'huîtres plates *Ostrea edulis* ont été retenues provenant du Danemark, de Corse et de Quiberon, pour une infection expérimentale par injection de parasites purifiés. Une partie des huîtres a été injectée avec de l'eau de mer. Les mêmes paramètres cellulaires et moléculaires que ceux étudiés en intra famille ont été mesurés sur des pools d'hémocytes provenant d'huîtres de chaque condition. En raison de fortes mortalités survenues dès la première semaine, il n'a pas été possible de réaliser l'ensemble des analyses envisagées. Néanmoins, les profils de mortalité et de réponse à l'injection observés étaient différents entre les populations testées ce qui suggère des scénarii de défense différents en fonction de l'origine et de l'historique des huîtres. En effet, Quiberon est une zone endémique vis-à-vis de *Bonamia ostreae* depuis une trentaine d'année, les huîtres de Corse présentent une faible prévalence d'infection à *B. ostreae* et également à *B. exitosa* ; enfin les huîtres danoises sont indemnes de bonamiose.

De façon intéressante, une étude complémentaire de caractérisation génétique de populations d'huîtres plates a été réalisée à l'échelle de son aire de distribution. Cette approche a permis d'identifier des groupes de populations en fonction des ensembles géographiques mer ou océan confirmant l'importance des épisodes de glaciations dans la structuration génétique des populations naturelles d'*Ostrea edulis*. Cependant, les barrières biogéographiques identifiées ne sont pas uniquement des barrières aux flux de gènes, mais elles séparent également des habitats suffisamment divergents pour poser l'hypothèse d'un phénomène de sélection positive divergente de part et d'autre de ces barrières, phénomène pouvant résulter d'une adaptation à des facteurs abiotiques (température, salinité, exondation...) mais aussi biotiques comme par exemple les parasites.

D. L'apoptose : un mécanisme de défense de l'huître parfois déjoué par le parasite

Nous avons précédemment vu des différences de modulation de l'apoptose en comparant les réponses moléculaires chez des huîtres plates résistantes et sensibles à la bonamiose (Morga et al., 2012). Plus particulièrement, les huîtres plates résistantes présentaient une surexpression de gènes impliqués dans l'apoptose tels que la cathepsine B, un inhibiteur d'apoptose (OelAP) et Fas-Ligand (OeFas-ligand) (Morga et al., 2012). Nous avons aussi pu identifier des e-QTLs associés à l'expression de ces gènes suggérant que plusieurs régions du génome sont impliquées dans la régulation de leur expression (Harrang, 2012). Ces résultats nous ont motivés pour aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'apoptose chez l'huître plate en réponse à la bonamiose.

L'apoptose est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, qui est physiologique, génétiquement programmée. Il s'agit d'un mécanisme complexe essentiel à l'organogenèse, au développement des tissus. C'est également un mécanisme important impliqué dans les réponses adaptatives à des stress environnementaux et biologiques. Dans ce contexte, la conséquence finale de ce mécanisme, la fragmentation de l'ADN est un paramètre mesuré pour évaluer la qualité des milieux aquatiques.

L'apoptose est également reconnue comme un mécanisme de défense important contre les virus, les bactéries et les parasites. En effet, la mort des cellules infectées est un moyen de limiter la dispersion de l'organisme pathogène en protégeant les tissus avoisinants. La récente publication du séquençage complet du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas* a révélé la présence de 48 gènes codant des protéines inhibiteurs de l'apoptose contre 8 identifiées chez l'homme et 7 chez l'oursin (Zhang et al., 2012). Ces résultats soulignent l'importance du système anti apoptotique chez les huîtres. Chez les bivalves marins, un certain nombre de gènes ou d'ESTs codant des éléments de la cascade apoptotique ont été identifiés qu'il s'agisse de la voie extrinsèque, activée par des récepteurs membranaires de la famille des TNF, ou de la voie intrinsèque, mettant particulièrement en jeu la mitochondrie (Figure 49).

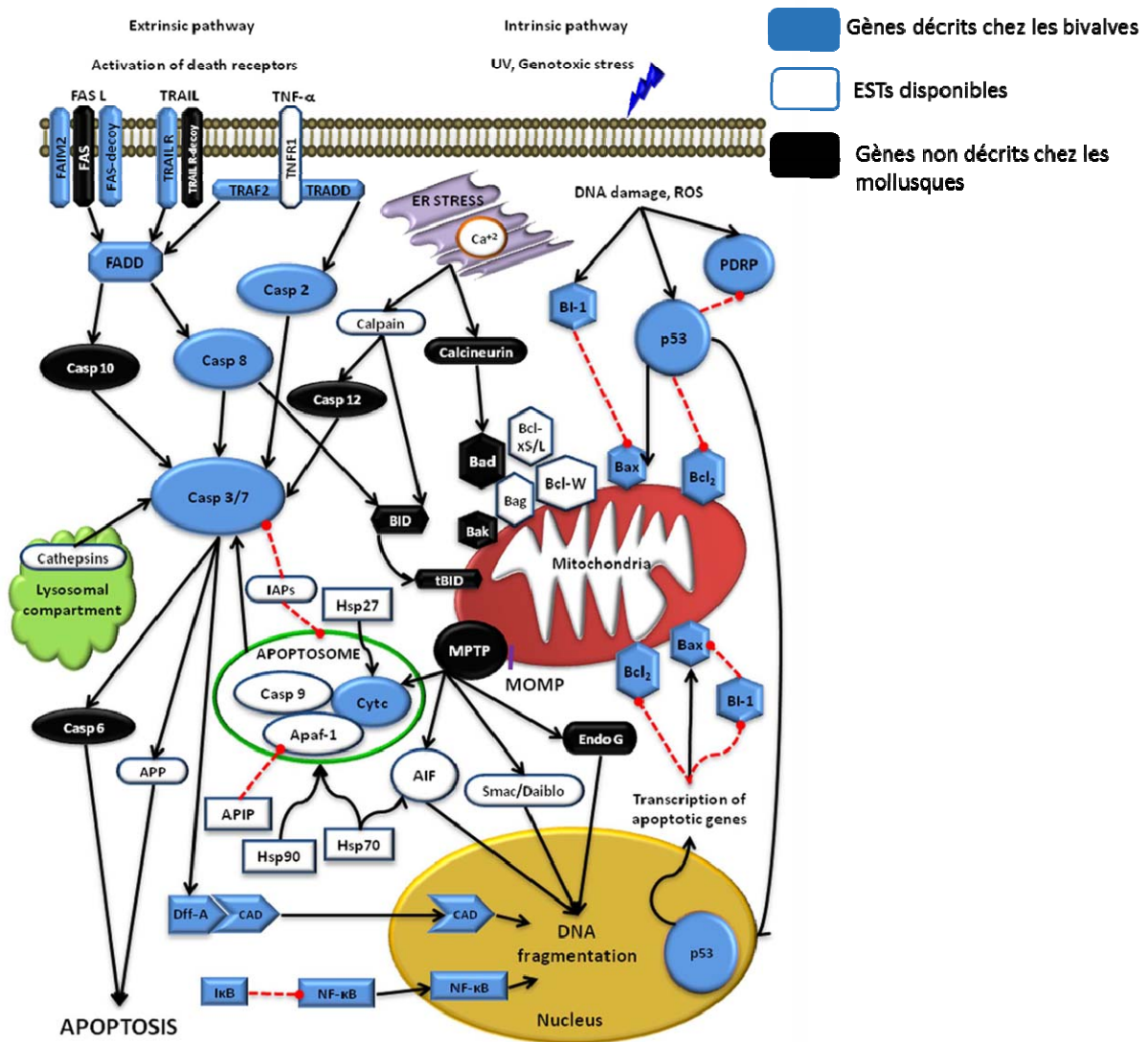


Figure 49. Schéma représentant les principales voies de l'apoptose chez les mollusques (Estévez-Calvar et al., 2013). Les symboles bleus indiquent les gènes décrits chez les bivalves, les symboles blancs indiquent les ESTs disponibles chez les bivalves et les symboles noirs représentent les gènes non décrits chez les mollusques. Les lignes rouges représentent des voies d'inhibition.

Par ailleurs, les organismes pathogènes ont eux-mêmes développé diverses stratégies afin de moduler l'apoptose des cellules de l'hôte. En particulier, l'inhibition de l'apoptose de la cellule hôte permet aux parasites protozoaires intracellulaires de prolonger leur durée de vie

et de favoriser leur prolifération (DosReis and Barcinski, 2001; Lüder et al., 2010). La modulation de l'apoptose par des parasites a également été montrée chez les mollusques (Sokolova, 2009), notamment par *Perkinsus marinus* chez l'huître creuse *Crassostrea virginica* (Hughes et al., 2010). Ainsi dans ce contexte, il semble essentiel de préciser le rôle de l'apoptose dans la réponse de l'huître plate à la bonamiose et la capacité de l'huître et du parasite à moduler ce phénomène.

Enfin, des mécanismes analogues à l'apoptose ont aussi été décrits chez des protozoaires parasites (Lüder et al., 2010; Reece et al., 2011). Ces mécanismes contribuent à la régulation des densités de cellules parasitaires dans leurs hôtes et vecteurs, à la différenciation des parasites, aux réponses au stress et à la modulation de la réponse de l'hôte. En effet, la phagocytose de cellules apoptotiques apparaît comme un puissant signal anti inflammatoire qui désactive les macrophages chez les vertébrés. Il semble donc intéressant de vérifier si de tels mécanismes existent chez *Bonamia ostreae*.

Une thèse est actuellement en cours au laboratoire pour étudier la réponse apoptotique de l'huître plate à la bonamiose. L'apoptose est un mécanisme se traduisant par une succession de modifications cellulaires résumées par la Figure 50. Un premier travail a consisté à mettre au point les outils de mesure de ces différentes modifications chez l'huître plate. Des inducteurs d'apoptose tels que UV, dexaméthasone ont été testés sur les hémocytes d'huîtres plates. Puis, l'effet de ces agents a été évalué en cytométrie en flux en mesurant l'activité calcique cytoplasmique, le potentiel mitochondrial, l'externalisation de la phosphatidyl sérine, l'activation de certaines caspases. Les cassures de l'ADN ont été mesurées par la méthode TUNEL par immunomarquage sur cellules cyto-centrifugées. De plus, des cellules exposées ou non aux inducteurs d'apoptose ont été observées en microscopie électronique à transmission afin d'évaluer les modifications ultrastructurales.

Les résultats obtenus montrent une réponse apoptotique des cellules exposées aux UV dès 1 heure post exposition avec une augmentation significative de tous les paramètres mesurés. En revanche, les cellules exposées à la dexaméthasone ne présentent qu'une augmentation du marquage TUNEL.

Cette première étape nous a permis de montrer que les UV induisent l'apoptose des hémocytes et de valider nos outils de mesure de l'apoptose chez l'huître plate.

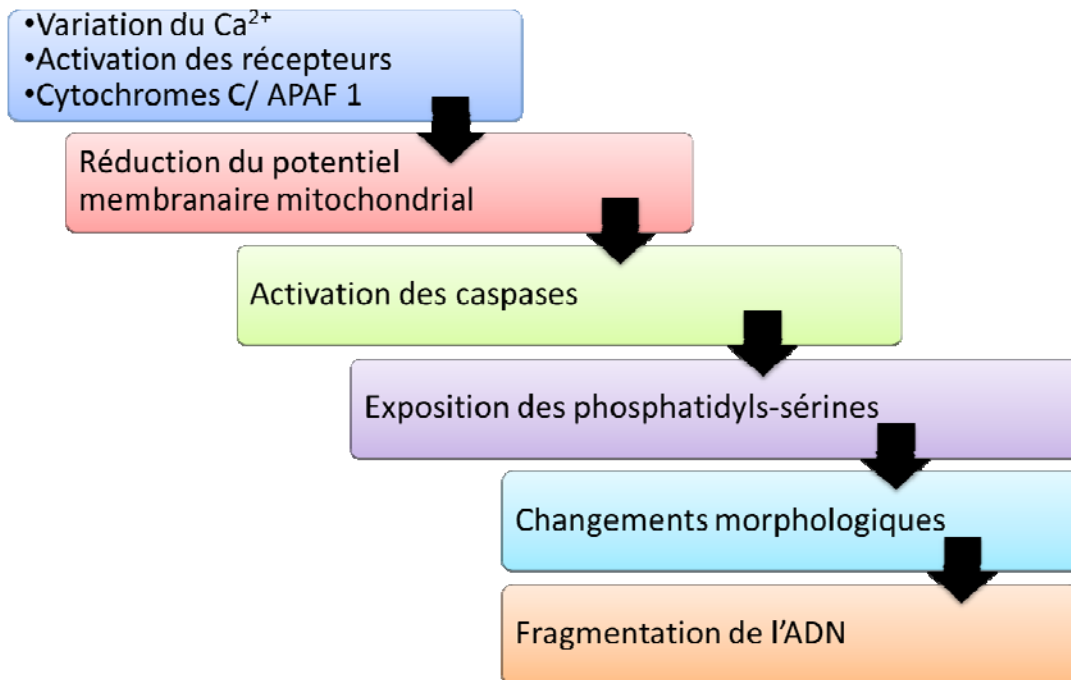


Figure 50. Modifications cellulaires survenant au cours de l'apoptose

Ces outils ont ainsi pu être utilisés pour mesurer l'effet apoptotique des parasites *Bonamia ostreae* purifiés sur les hémocytes *in vitro*. Des expériences de mise en contact entre hémocytes et parasites vivants ou inactivés à la chaleur ont été réalisées. Les résultats indiquent une modification de l'ensemble des paramètres mesurés lorsque les hémocytes sont mis en contact avec des parasites vivants, ceci dès 1 heure de contact (Figure 51). Ces modifications semblent spécifiquement induites par le parasite dans la mesure où la mise en contact avec des parasites inactivés à la chaleur présente moins d'impact sur les paramètres testés.

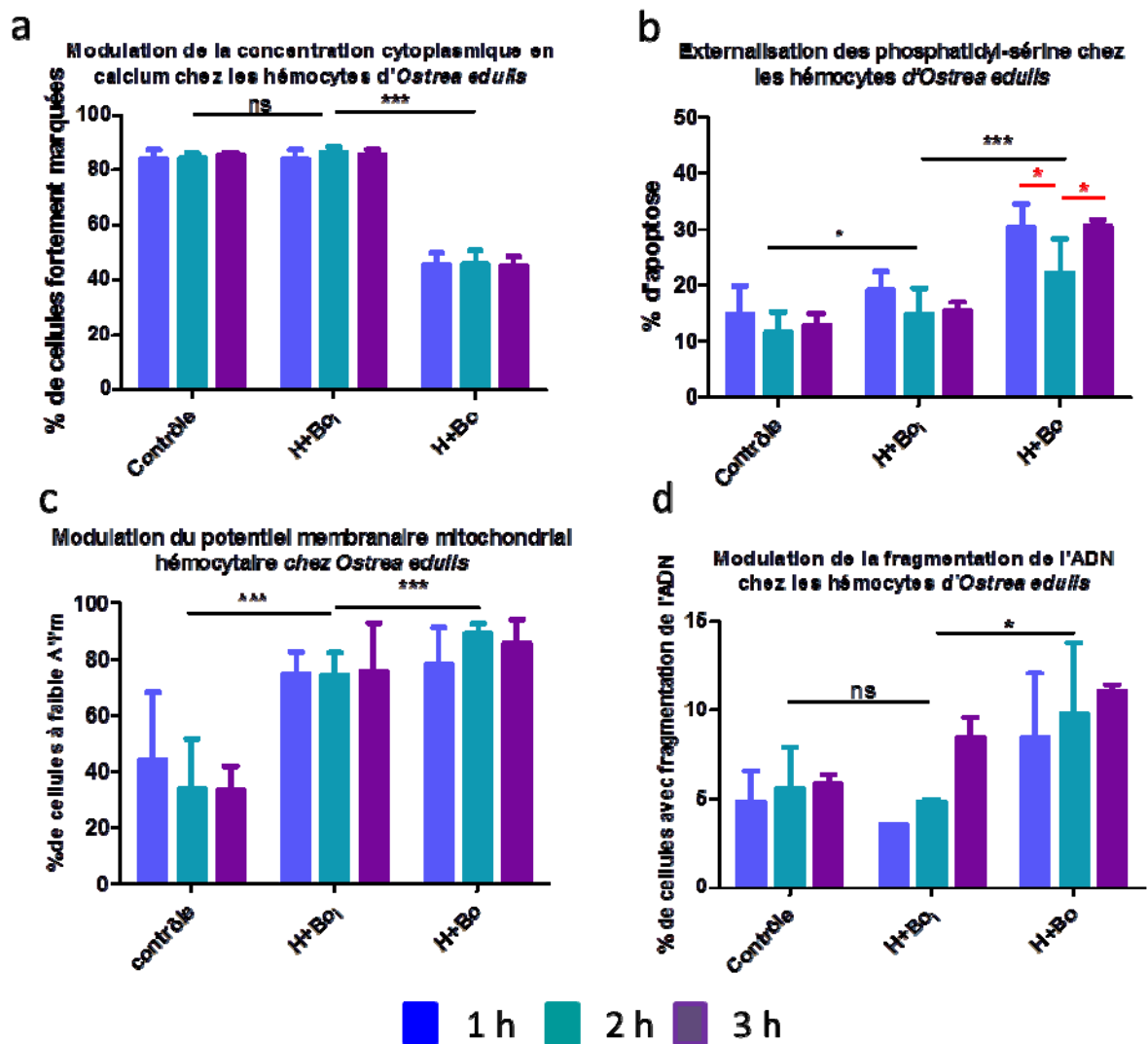


Figure 51. Réponse apoptotique des hémocytes (H) à la présence de *Bonamia ostreae* vivant (Bo) ou inactivé (Boi) à la chaleur après 1h, 2h et 3h de contact (n= 6). A) Pourcentages de cellules fortement marquées pour le calcium intra cytoplasmique, b) pourcentages de cellules marquées à l'annexine, c) pourcentages de cellules présentant un faible potentiel mitochondrial, d) pourcentages de cellules présentant une fragmentation de l'ADN par marquage TUNEL.

Ces premiers résultats démontrent ainsi que l'infection des hémocytes par *Bonamia ostreae* déclenche l'apoptose des hémocytes. L'apoptose apparaît ainsi comme un mécanisme important de défense de l'huître vis-à-vis de ce parasite intrahémocytaire. Néanmoins, nos conditions d'incubation (inférieures à 4h) ne nous permettent pas d'évaluer l'effet potentiellement antagoniste du parasite sur l'apoptose hémocytaire.

Des inhibiteurs d'apoptose tels que le Z-Vad-FMK (inhibiteur de caspases), la pifithrin α (inhibiteur de la protéine p53) et la cyclosporine A (inhibiteur de la voie mitochondriale) ont été testés dans le cadre d'expériences préliminaires. Dans les conditions testées, seule la fragmentation de l'ADN (manifestation tardive de l'apoptose) est apparue inhibée en présence des inhibiteurs retenus. De nouveaux essais sont envisagés en utilisant d'autres inhibiteurs et en modifiant les conditions expérimentales telles que le temps d'incubation et les concentrations d'inhibiteurs.

Ces expériences *in vitro* doivent être complétées par des infections expérimentales *in vivo* réalisées par injection de parasites. Différents groupes d'huîtres ont été injectés avec du parasite : des huîtres creuses *Crassostrea gigas*, des huîtres plates *Ostrea edulis* provenant de Quiberon (Morbihan) et des huîtres plates provenant de l'Etang de Diana (Corse). Les huîtres prélevées à différents temps post injection seront analysées à l'aide des outils cellulaires et moléculaires préalablement développés (Gervais et al., 2014; Morga et al., 2012). En parallèle, les données de séquence obtenues par l'approche RNAseq sur *Bonamia ostreae* sont actuellement en cours d'analyse afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes de mort cellulaire programmée. La caractérisation de ces gènes permettra de développer des outils de PCR en temps réel pour mesurer leur expression et ainsi d'évaluer la réponse apoptotique du parasite lors de l'infection.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'apoptose est souvent utilisée pour évaluer la qualité des milieux aquatiques en eau douce mais également dans le milieu marin. La fragmentation de l'ADN a ainsi été mesurée sur des moules ou des éponges afin d'évaluer l'impact de marée noire sur la santé des écosystèmes (Baršienė et al., 2012; Châtel et al., 2011). Il apparaît donc pertinent d'évaluer dans quelle mesure la dégradation du milieu influe sur la réponse apoptotique de l'huître plate à la bonamiose et plus largement sur la réponse des bivalves à des organismes pathogènes.

E. Conclusion

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la course aux armements qui se produit dans un système hôte-parasite peut être symbolisée par deux filtres, l'un représentant la rencontre, l'autre la compatibilité. La sélection naturelle s'efforce d'ouvrir les deux filtres dans le génome du parasite et elle s'efforce de les fermer dans le génome des hôtes.

L'adaptation de protocoles expérimentaux, l'acquisition de données de séquences et la mise au point d'outils moléculaires et de cytométrie en flux nous ont permis de mieux décrire cette course dans le modèle huître plate-*Bonamia ostreae*. Nous avons ainsi pu préciser certaines réponses de l'huître à l'infection ou comment l'huître tente de fermer le filtre de compatibilité par exemple en internalisant le parasite (augmentation expression Oe-Gal ; phagocytose) et en activant les gènes impliqués dans sa dégradation (augmentation expression lysosyme, Cytochrome p450, TIMP, IRF). La comparaison de la réponse à la bonamiose entre des huîtres sélectionnées et non sélectionnées nous a permis d'identifier des mécanismes contribuant à accentuer la fermeture du filtre de compatibilité. Plus particulièrement une moindre phagocytose du parasite et une activation de l'apoptose dans les cellules infectées permettent de diminuer la phase de dispersion et de multiplication du parasite au sein des hémocytes.

Bonamia ostreae est un parasite intra hémocytaire et favorise activement son internalisation en activant l'expression d'un récepteur, la galectine, et la phagocytose. Mais une fois internalisé, il doit développer des mécanismes pour survivre dans ce milieu hostile et échapper aux voies de dégradation. Nous avons pu observer une multiplication du parasite dans les hémocytes associée à une diminution de la flambée oxydative ainsi qu'une sur expression de gène inhibiteur de l'apoptose (Oe-IAP). Des travaux sont en cours pour mieux comprendre comment ce processus d'apoptose est activé par la présence du parasite mais également déjoué par celui-ci.

Les travaux visant à mieux comprendre les interactions entre *Ostrea edulis* et *Bonamia ostreae* ont jusqu'à présent considéré la réponse de l'huître à l'infection. Les données de séquences de *B. ostreae* aujourd'hui disponibles nous permettent d'envisager d'étudier plus particulièrement la réponse du parasite lorsqu'il infecte une huître et de comparer son comportement au sein d'un hôte sensible et d'un hôte résistant.

Perspectives

L'ensemble des travaux présentés a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les protozoaires parasites des bivalves marins en précisant les espèces ou les types de parasites rencontrés, en étudiant leur spectre d'hôtes et leur cycle. Nous avons aussi exploré le dialogue entre le parasite et son hôte à l'échelle cellulaire et à l'échelle de l'huître. Les résultats obtenus posent de nouvelles questions et les outils actuellement disponibles permettent d'envisager de nouvelles études. Parmi les perspectives qui se dessinent, je souhaiterais m'investir plus particulièrement dans les trois axes suivants :

- **Associations parasites protozoaires-microorganismes**

Jusqu'alors nous nous sommes intéressés à quelques protozoaires parasites des bivalves marins. De plus, lorsque nous étudions les interactions hôte-parasite nous ne considérons pas les potentielles interactions entre divers microorganismes. Or, un hôte sert naturellement d'habitat à toute une communauté de microorganismes. Donc pour étudier l'ampleur des pressions parasitaires subies par des hôtes dans leur milieu il est nécessaire de s'intéresser à cette diversité. Il apparaît aujourd'hui évident que les microorganismes associés à l'hôte et au parasite jouent un rôle important dans la co-évolution. D'un côté les microorganismes associés à l'hôte peuvent contribuer aux mécanismes de défenses contre les parasites et d'autre part les microorganismes associés aux parasites peuvent participer à l'expression d'une maladie. Aussi apparaît-il essentiel de s'intéresser non seulement aux interactions entre l'hôte et le parasite mais aussi à l'ensemble des micro-organismes associés à l'un et à l'autre et donc aux interactions entre holobionte-hôte et holobionte-parasite (Dheilly, 2014).

Par des approches larges de séquençage, je souhaiterais pouvoir comparer la communauté de microorganismes associée aux parasites protozoaires que nous étudions dans le milieu où vivent les bivalves et dans les bivalves eux-mêmes lorsqu'ils sont malades et non malades. Cette comparaison nous permettrait d'identifier des associations bénéfiques pour le parasite ou pour l'hôte. Cette étude a été proposée dans le cadre d'un projet régional visant à

relancer la production d'huîtres plates en Bretagne et permettrait en outre par l'approche de séquençage des micro-organismes dans le milieu d'évaluer la possibilité d'utiliser des approches de type e-DNA (environmental DNA) pour établir le statut d'un site vis-à-vis de certaines maladies.

- **les interactions hôtes parasites à l'heure de la génomique fonctionnelle**

Nous avons étudié les interactions hôte-parasite à travers des approches transcriptomiques et microscopiques qui permettent de décrire la réponse de l'hôte à l'infection. La caractérisation de certains gènes tels que la galectine chez l'huître plate ou HSP90 chez *Bonamia ostreae* a motivé la réalisation d'essais expérimentaux permettant de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance et d'invasion des parasites dans les hémocytes. Comme nous l'avons vu dans l'étude de la galectine, la synthèse de protéine recombinante et d'anticorps polyclonaux offre des perspectives intéressantes pour aller plus loin dans l'étude des interactions hôte-parasite. Une approche comparable couplée à l'utilisation de microscopie à épi-fluorescence est d'ailleurs envisagée pour étudier l'implication de la protéine Fas – ligand dans le déclenchement de l'apoptose en réponse à la bonamiose.

De plus, nos connaissances actuelles des génomes/transcriptomes de l'huître et de certains parasites nous permettent d'envisager des approches d'ARN interférence (ARNi) qui se mettent actuellement en place au laboratoire. En effet, cette technique aujourd'hui de plus en plus utilisée en génomique fonctionnelle est l'une des méthodes qui permet de démontrer l'implication d'un gène dans un processus infectieux lorsque des mutants génétiques ne sont pas disponibles (Kolev et al., 2011). L'inhibition du gène d'intérêt se traduit au niveau phénotypique par la suppression ou la réduction significative de l'impact pathogène ciblé. Chez les mollusques bivalves marins, une telle approche a été utilisée pour la première fois avec succès *in vivo* pour démontrer l'implication du gène oyster vasa-like (Oyvlg) dans le développement des cellules germinales chez l'huître (Fabioux et al., 2009). Récemment l'implication potentielle de certains gènes d'huître dans la susceptibilité ou la résistance de l'huître creuse à l'herpèsvirus OsHV-1 a été investiguée par cette approche et peut donc être transposée à d'autres modèles tel que l'huître plate et *Bonamia ostreae*.

- **l'influence de l'environnement sur les interactions hôte-parasite**

Nous avons étudié les interactions entre l'hôte et le parasite à l'échelle de la cellule, de l'individu et des populations dans l'étude des interactions huîtres plates *Bonamia ostreae* et moules *Marteilia refringens*. A de trop rares occasions nous avons évalué l'impact potentiel des facteurs environnementaux sur ces interactions. Dans un contexte d'évolution climatique et de dégradation du milieu liée aux activités anthropiques, il apparaît aujourd'hui essentiel d'intégrer ces facteurs dans nos études.

Un projet de post doctorat portant sur l'influence de la température sur les interactions entre mucus et parasites protozoaires a été proposé et retenu. Nous avons en effet montré que les organes palléaux pour *Bonamia ostreae*, et le système digestif pour *Marteilia refringens* jouent un rôle prépondérant dans l'entrée de ces parasites dans l'huître plate ou la moule. Or ces organes sont couverts de mucus notamment constitué de facteurs impliqués dans les mécanismes de défense. Le mucus joue donc le rôle de barrière mais il peut également procurer un environnement favorable à la survie de certains organismes pathogène comme cela a été montré pour *Perkinsus marinus* (Pales-Espinosa et al., 2014). Aussi l'évaluation de la survie et du pouvoir pathogène des parasites protozoaires en présence de mucus d'espèces bivalves sensibles et résistantes nous permettra de nous intéresser à cette barrière encore peu étudiée dans nos modèles et d'évaluer la spécificité de la réponse de l'hôte. De plus, considérant l'impact potentiel des variations de l'environnement sur l'émergence et la dynamique des maladies en milieu aquatique et plus particulièrement marin, nous évaluerons l'effet de la température sur l'efficacité de cette barrière.

Enfin, nous avons montré l'importance de l'apoptose dans la réponse de l'huître plate à la bonamiose. De nombreux travaux mettent en évidence l'influence de la qualité du milieu sur ce mécanisme et la fragmentation de l'ADN est souvent utilisée comme marqueur pour évaluer l'impact de polluants tels que les hydrocarbures ou de blooms phytoplanctoniques sur un écosystème. Nous proposons donc d'évaluer dans quelle mesure la réponse apoptotique de l'huître à *Bonamia ostreae* est influencée par la qualité du milieu en comparant cette réponse *in situ* dans des environnements contrastés et expérimentalement en présence d'algues toxiques.

Références bibliographiques

- Abollo, E., Ramilo, A., M., C.S., Comesana, P., Cao, A., Caraballal, M.J., Villalba, A., 2008. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture* 274, 201–207.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–514. doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
- Ahn, H.-J., Kim, S., Nam, H.-W., 2003. Molecular cloning of the 82-kDa heat shock protein (HSP90) of *Toxoplasma gondii* associated with the entry into and growth in host cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 654–659.
- Allam, B., Carden, W.E., Evan Ward, J., Ralph, G., Winnicki, S., Espinosa, E.P., 2012. Early host-pathogen interactions in marine bivalves: Evidence that the alveolate parasite *Perkinsus marinus* infects through the oyster mantle during rejection of pseudofeces. *J. Invertebr. Pathol.* 26-34. doi: 10.1016/j.jip.2012.12.011.
- Allam, B., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 374–383.
- Anderson, R.S., Bureson, E.M., Paynter, K.T., 1995. Defense Responses of Hemocytes Withdrawn from *Crassostrea virginica* Infected with *Perkinsus marinus*. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 82–89. doi:10.1006/jipa.1995.1065
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G., Berthe, F.C.J., 2008. Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 326–331. doi:10.1016/j.jip.2008.08.002
- Arzul, I., Chollet, B., Boyer, S., Bonnet, D., Gaillard, J., Baldi, Y., Robert, M., Joly, J. P., Garcia, C., Bouchoucha, M., 2013. Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology* 141, 227–240.
- Arzul, I., Chollet, B., Garcia, C., Robert, M., Joly, J.-P., Miossec, L., Berthe, F., 2005. *Ostrea conchaphila*: a natural host of *Bonamia ostreae*? *J. Shellfish Res.* 24, 638–639.
- Arzul, I., Chollet, B., Michel, J., Robert, M., Garcia, C., Joly, J.P., Francois, C., Miossec, L., 2012. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. *Parasitology* 139, 1757–1771.
- Arzul, I., Gagnaire, B., Bond, C., Chollet, B., Morga, B., Ferrand, S., Robert, M., Renault, T., 2009. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.* 85, 67–75.
- Arzul, I., Langlade, A., Chollet, B., Robert, M., Ferrand, S., Omnes, E., Lerond, S., Couraleau, Y., Joly, J.P., François, C., Garcia, C., 2011. Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Vet. Parasitol.* :69-76. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.060.
- Audemard, C., 2001. Stratégie d'utilisation de différentes espèces animales par le parasite *Marteilia refringens* pour assurer son cycle biologique. Thèse de doctorat universitaire. Université de Perpignan

- Audemard, C., Barnaud, A., Collins, C.M., Le Roux, F., Sauriau, P., Coustau, C., Blachier, P., Berthe, F.C., 2001. Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *J Exp Mar Biol Ecol* 257, 87–108.
- Audemard, C., Sajus, M.C., Barnaud, A., Sautour, B., Sauriau, P.G., Berthe, F.J., 2004. Infection dynamics of *Marteilia refringens* in flat oyster *Ostrea edulis* and copepod *Paracartia grani* in a claire pond of Marennes-Oleron Bay. *Dis Aquat Organ* 61, 103–11.
- Audemard, C., Stokes, N.A., Burreson, E., Bishop, M., 2005. Salinity effects on the susceptibility to and persistence of *Bonamia ostreae* and *Bonamia* sp. in *Crassostrea ariakensis*. *J. Shellfish Res.* 24, 639.
- Auffret, M., Poder, M., 1983. Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les cotes de Bretagne nord. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 47, 105–109.
- Azevedo, C., 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.* 75, 627–635.
- Balouet, G., Chastel, C., Cahour, A., Quillard, A., Poder, M., 1979. Etude épidémiologique et parasitologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. *Sci. Pêche Bull. Inst. Pêch. Marit.* 289, 13–23.
- Barber, I., Hoare, D., Krause, J., 2000. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 131–165. doi:10.1023/A:1016658224470
- Baršienė, J., Rybakovas, A., Garnaga, G., Andreikėnaitė, L., 2012. Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels before and after an oil spill at the marine oil terminal in the Baltic Sea. *Environ. Monit. Assess.* 184, 2067–2078. doi:10.1007/s10661-011-2100-0
- Bédier, E., 2001. L'amélioration des performances de l'huître plate européenne *Ostrea edulis* par la sélection génétique. Journées Conchylicoles du Département Ressources Aquacoles Avril 2001 IFREMER
- Berthe, F.C., Le Roux, F., Peyretailade, E., Peyret, P., Rodriguez, D., Gouy, M., Vivares, C.P., 2000. Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990). *J Eukaryot Microbiol* 47, 288–93.
- Blackbourn, J., Bower, S.M., Meyer, G.R., 1998. *Perkinsus qugwadi* sp.nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.* 76, 942–953.
- Bouchet, P., Rocroi, J.-P., Bieler, R., Carter, J.G., Coan, E.V., 2010. Nomenclator of Bivalve Families with a Classification of Bivalve Families. *Malacologia* 52, 1–184. doi:10.4002/040.052.0201
- Bougrier, S., Tige, G., Bachere, E., Grizel, H., 1986. *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. *Aquaculture* 58, 151–154.
- Boyer, S., 2012. Ecologie du copépode calanoïde *Paracartia grani* : implication dans le cycle de vie du parasite *Marteilia refringens* dans la lagune de Thau. Thèse de doctorat universitaire. Université Montpellier II.
- Boyer, S., Arzul, I., Bonnet, D., 2012. Some like it hot: *Paracartia grani* (Copepoda: Calanoida) arrival in the Thau lagoon (south of France, Mediterranean Sea). *Mar. Biodivers. Rec.* 5, 1-5 doi:10.1017/S175526721200056.
- Boyer, S., Bonnet, D., 2013. Triggers for hatching of *Paracartia grani* (Copepoda: Calanoida) resting eggs: an experimental approach. *J. Plankton Res.* doi:10.1093/plankt/fbt020
- Boyer, S., Chollet, B., Bonnet, D., Arzul, I., 2013. New evidence for the involvement of *Paracartia grani* (Copepoda, Calanoida) in the life cycle of *Marteilia refringens* (Paramyxea). *Int. J. Parasitol.* 43, 1089–1099.
- Bréhelin, M., Bonami, J.-R., Cousserand, F., Vivarès, C.P., 1982. Existence de formes plasmodiales vraies chez *Bonamia ostreae* parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*. *C. r. Académie Sci. Paris* 295, 45–48.
- Burki, F., Kudryavtsev, A., Matz, M.V., Aglyamova, G.V., Bulman, S., Fiers, M., Keeling, P.J., Pawlowski, J., 2010. Evolution of Rhizaria: new insights from phylogenomic analysis of uncultivated protists. *BMC Evol. Biol.* 10, 377. doi:10.1186/1471-2148-10-377

- Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Pawlowski, J., 2008. Phylogenomics reveals a new “megagroup” including most photosynthetic eukaryotes. *Biol. Lett.* 4, 366–369. doi:10.1098/rsbl.2008.0224
- Burreson, E.M., Reece, K.S., Dungan, C.F., 2005. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *J Eukaryot Microbiol* 52, 258–70.
- Bushek, D., Landau B., E., S., 2008. *Perkinsus chesapeaki* in stout razor clams *Tagelus plebeius* from Delaware Bay. *Aquat Org* 78, 243–247.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Butet, N.A., Solihin, D.D., Soewardi, K., Saefuddin, A., 2014. Actin gene from blood cockle *Anadara granosa* as a potential housekeeping gene for gene expression analysis. *Emir. J. Food Agric.* 26, doi: 10.9755/ejfa.v26i8.15765. doi:10.9755/ejfa.v26i8.15765
- Cahour, A., 1979. *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. *Mar. Fish. Rev.* 19–20.
- Camacho, A.P., Villalba, A., Beiras, R., Labarta, U., 1997. Absorption efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* Linnaeus) of Galicia (NW Spain) infected by parasites *Marteilia refringens* Grizel et al. and *Mytilicola intestinalis* Steuer. *J. Shellfish Res.* 16, 77–82.
- Carnegie, R.B., Barber, B.J., Culloty, S.C., Figueras, A.J., Distel, D.L., 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Dis. Aquat. Organ.* 42, 199–206.
- Carnegie, R.B., Burreson, E.M., Hine, P.M., Stokes, N.A., Audemard, C., Bishop, M.J., Peterson, C.H., 2006. *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a Parasite of the Oyster *Ostrea equestris*, is the First *Bonamia* Species Known to Produce Spores. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 232–245.
- Carnegie, R.B., Cochenec-Laureau, N., 2004. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Resour.* 17, 519–528. doi:10.1051/alr:2004055
- Carnegie, R.B., Hill, K.M., Stokes, N.A., Burreson, E.M., 2013. The haplosporidian *Bonamia exitiosa* is present in Australia, but the identity of the parasite described as *Bonamia* (formerly *Mikrocytos*) *roughleyi* is uncertain. *J. Invertebrate Pathol.* 115, 33–40.
- Carrasco, N., Arzul, I., Berthe, F.C.J., Fernandez-Tejedor, M., Dufort, M., Furones, M.D., 2008a. Delta de l’Ebre is a natural bay model for *Marteilia* spp. (Paramyxea) dynamics and life-cycle studies. *Dis. Aquat. Org.* 79, 65–73.
- Carrasco, N., Arzul, I., Chollet, B., Robert, M., Joly, J.-P., Furones, D., Berthe, F.C.J., 2008b. Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *Marteilia maurini*. *J. Fish Dis.* 31, 497–504.
- Carrasco, N., Hine, P.M., Dufort, M., Andree, K.B., Malchus, N., Lacuesta, B., González, M., Roque, A., Rodgers, C., Furones, M.D., 2013. *Marteilia cochillia* sp nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters. *Aquaculture* 412–413, 223–230.
- Carrasco, N., Lopez-Flores, I., Alcaraz, M., Furones, M.D., Berthe, F.C.J., Arzul, I., 2007. Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology* 134, 1541–1550.
- Carrasco, N., Rojas, M., Aceituno, P., Andree, K.B., Lacuesta, B., Furones, M.D., 2014. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. *J. Invertebr. Pathol.* 117, 56–60. doi:10.1016/j.jip.2014.01.009
- Carrasco, N., Villalba, A., Andree, K.B., Engelsma, M.Y., Lacuesta, B., Ramilo, A., Gairin, I., Furones, M.D., 2012. *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) observed infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* cultured on the Spanish Mediterranean coast. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 307–313.

- Casas, S.M., Grau, A., Reece, K.S., Apakupakul, K., Azevedo, C., Villalba, A., 2004. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Dis. Aquat. Organ.* 58, 231–244.
- Casas, S.M., Villalba, A., Reece, K.S., 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Organ.* 50, 51–65.
- Cavalier-Smith, T., 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 297–354.
- Cavalier-Smith, T., Chao, E.E.Y., 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* 154, 341–358. doi:10.1078/143446103322454112
- Ceschia, G., Zanchetta, S., Sello, M., Montesi, F., Antonetti, P., Figueras, A., 2001. Presenza di parassiti in cannolicchi (*Ensis minor* e *Ensis siliqua*) pescati nell'area costiera del Mar Tirreno meridionale e del Mar Adriatico. *Bolletino Soc. Ital. Patol. Ittica* 30, 20–27.
- Chagot, D., Boulo, V., Hervio, D., Mialhe, E., Bachere, E., Mourton, C., Grizel, H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 241–249.
- Chaparro, O.R., Thompson, R.J., Ward, J.E., 1993. *In vivo* Observations of Larval Brooding in the Chilean Oyster, *Ostrea chilensis* Philippi, 1845. *Biol. Bull.* 185, 365–372. doi:10.2307/1542477
- Châtel, A., Talarmin, H., Hamer, B., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., Dorange, G., 2011. MAP kinase cell signaling pathway as biomarker of environmental pollution in the sponge *Suberites domuncula*. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 20, 1727–1740. doi:10.1007/s10646-011-0706-1
- Chen, B., Zhong, D., Monteiro, A., 2006. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7, 156. doi:10.1186/1471-2164-7-156
- Choi, K.-S., Park, K.-I., 2005. Review on the Protozoan Parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) Infection in Asian Waters. *Coast. Environ. Ecosyst. Issues East China Sea* 269–281.
- Chu, F.-L.E., 2000. Defense mechanism of marine bivalves., in: *Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology*. Sciences publishers, Enfield (NH) USA; Plymouth UK, pp. 1–42.
- Chu, F.L.E., La Peyre, J.F., 1993. Development of disease caused by the parasite, *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. *J. Shellfish Res* 12, 21–27.
- Clark, C.G., 2000. Cryptic genetic variation in parasitic protozoa. *J. Med. Microbiol.* 49, 489–491.
- Cochennec Laureau, N., Reece, K.S., Berthe, F.C.J., Hine, P.M., 2003. *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation leads to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Dis. Aquat. Organ.* 54, 209–217.
- Cochennec, N., 2001. *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*: sa position taxonomique parmi les parasites du groupe "microcell", analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse de doctorat universitaire. Université de La Rochelle.
- Cochennec, N., Le Roux, F., Berthe, F., Gerard, A., 2000. Detection of *Bonamia ostreae* Based on Small Subunit Ribosomal Probe. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 26–32.
- Coleman, A.W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet. TIG* 19, 370–375. doi:10.1016/S0168-9525(03)00118-5
- Combes, C., 1995. *Interactions durables: écologie et évolution du parasitisme*. Eds Masson. 524 p
- Combes, C., 2001. *Les associations du vivant: l'art d'être parasite*. Eds Flammarion. 348 p
- Combes, C., Théron, A., 2000. Metazoan parasites and resource heterogeneity: constraints and benefits. *Int. J. Parasitol.* 30, 299–304.
- Comesaña, P., Casas, S.M., Cao, A., Abollo, E., Arzul, I., Morga, B., Villalba, A., 2012. Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 274–286. doi:10.1016/j.jip.2011.12.007

- Comps, M., 1970. Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit. 34, 317–326.
- Comps, M., 1976. *Marteilia lengehi* n.sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 40, 347–349.
- Comps, M., 1979. Etude du cycle de *Marteilia refringens* dans l'étang de Thau. Cons. Int. Pour Exploit. Mer C.M. 1979/F:19, 5 pp.
- Comps, M., 1985. Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp.n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pelecypode). Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 47, 99–104.
- Comps, M., Grizel, H., Papayanni, Y., 1982. Infection parasitaire causée par *Marteilia maurini* sp. n. chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. Cons. Int. Pour Exploit. Mer C.M. 1982/F:24, 3 pp.
- Comps, M., Grizel, H., Tige, G., Duthoit, J.L., 1975. Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule* L. C. r. Académie Sci. Paris t. 281, 179–181.
- Comps, M., Park, M.S., Desportes, I., 1986. Fine structure of *Marteilioides chungmuensis* n.g., n.sp., parasite of the oocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. Protistologica, XXII, fasc. 3, 279–285
- Comps, M., Tige, G., Grizel, H., 1980. Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. C. r. Académie Sci. Paris 290, 383–385.
- Corbeil, S., Arzul, I., Diggles, B.K., Heasman, M., Chollet, B., Berthe, F.C.J., Crane, M.S.J., 2006a. Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia species*. Dis. Aquat. Organ. 71, 75–80.
- Corbeil, S., Arzul, I., Robert, M., Berthe, F.C.J., Besnard-Cochennec, N., Crane, M.S.J., 2006b. Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. Dis. Aquat. Organ. 71, 81–85.
- Coss, C.A., Robledo, J.A., Ruiz, G.M., Vasta, G.R., 2001. Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. J Eukaryot Microbiol 48, 52–61.
- Culloty, S.C., Novoa, B., Pernas, M., Longshaw, M., Mulcahy, M.F., Feist, S.W., Figueras, A., 1999. Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. Dis. Aquat. Organ. 37, 73–80.
- Curtin, J.F., Cotter, T.G., 2003. Apoptosis: Historical perspectives. Essays Biochem. 39, 1–10.
- D'Andrea, L.D., Regan, L., 2003. TPR proteins: the versatile helix. Trends Biochem. Sci. 28, 655–662. doi:10.1016/j.tibs.2003.10.007
- Dame, R., 1993. Bivalve Filter Feeders and Estuarine and Coastal Ecosystem Processes: Conclusions, in: Dame, R.F. (Ed.), Bivalve Filter Feeders, Nato ASI Series. Springer Berlin Heidelberg, pp. 565–569.
- Danic-Tchaleu, G., Heurtebise, S., Morga, B., Lapègue, S., 2011. Complete mitochondrial DNA sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* confirms Ostreidae classification. BMC Res. Notes 4, 400. doi:10.1186/1756-0500-4-400
- De Zoysa, M., Nikapitiya, C., Moon, D.-O., Whang, I., Kim, G.-Y., Lee, J., 2009. A novel Fas ligand in mollusk abalone: molecular characterization, immune responses and biological activity of the recombinant protein. Fish Shellfish Immunol. 27, 423–432. doi:10.1016/j.fsi.2009.06.019
- Desportes, I., Ginsburger-Vogel, T., 1977. Affinité du genre *Marteilia*, parasites d'huîtres (maladie des Abers) et du crustacé *Ochestia gammarellus* (Pallas), avec les Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies. C. r. Académie Sci. Paris t. 285, 1111–1114.
- Dheilly, N.M., 2014. Holobiont–Holobiont Interactions: Redefining Host–Parasite Interactions. PLoS Pathog 10, e1004093. doi:10.1371/journal.ppat.1004093
- Dinamani, P., Hine, P.M., Jones, J.B., 1987. Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster, *Tiostrea lutaria*. Dis. Aquat. Organ. 3, 37–44.
- DosReis, G.A., Barcinski, M.A., 2001. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. Adv. Parasitol. 49, 133–161.

- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 939–945. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.007
- Dungan, C.F., Hamilton, R.M., Hudson, K.L., McCollough, C.B., Reece, K.S., 2002. Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. *Aquat Org* 50, 67–78.
- Dungan, C.F., Reece, K.S., 2006. *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 316–326. doi:10.1111/j.1550-7408.2006.00120.x
- Ebert, D., Mangin, K.L., 1997. The Influence of Host Demography on the Evolution of Virulence of a Microsporidian Gut Parasite. *Evolution* 51, 1828–1837. doi:10.2307/2411005
- Echeverria, P.C., Matrajt, M., Harb, O.S., Zappia, M.P., Costas, M.A., Roos, D.S., Dubremetz, J.F., Angel, S.O., 2005. *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated. *J. Mol. Biol.* 350, 723–734. doi:10.1016/j.jmb.2005.05.031
- Eisen, J.A., Fraser, C.M., 2003. Phylogenomics: intersection of evolution and genomics. *Science* 300, 1706–1707. doi:10.1126/science.1086292
- Elgharsalli, R., Aloui-Bejaoui, N., salah, H., Chollet, B., Joly, J.-P., Robert, M., Couraleau, Y., Arzul, I., 2013. Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia. *J. Invertebr. Pathol.* 112, 175–183.
- Elston, R.A., 1984. Prevention and Management of Infectious Diseases in Intensive Mollusc Husbandry. *J. World Maric. Soc.* 15, 284–300. doi:10.1111/j.1749-7345.1984.tb00163.x
- Elston, R.A., 1990. Mollusc diseases. Guide for the Shellfish Farmers. Washington Sea Grant. Univ. Washington, USA, 73 p.
- Engelsma, M.Y., Kerkhoff, S., Roozenburg, I., Haenen, O.L.M., van Gool, A., Sistermans, W., Wijnhoven, S., Hummel, H., 2010. Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat oyster *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 409, 131–142.
- Estévez-Calvar, N., Romero, A., Figueras, A., Novoa, B., 2013. Genes of the Mitochondrial Apoptotic Pathway in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE* 8, e61502. doi:10.1371/journal.pone.0061502
- Euzet, L., Combes, C., 1980. Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. *Bull Soc Zool Fr* 239–285.
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A., 2009. *In vivo* RNA interference in oyster – vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS J.* 276, 2566–2573. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x
- FAO, 2012. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture - 2012 [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/docrep/016/i2727f/i2727f00.htm> (accessed 7.15.14).
- Farley, C.A., Wolf, P.H., Elston, R.A., 1988. A long-term study of “microcell” disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fish. Bull.* 86, pp. 581–594.
- Fast, N.M., Xue, L., Bingham, S., Keeling, P.J., 2002. Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 30–37.
- Feist, S.W., Hine, P.M., Bateman, K.S., Stentiford, G.D., Longshaw, M., 2009. *Paramarteilia canceri* sp n. (Cercozoa) in the European edible crab (*Cancer pagurus*) with a proposal for the revision of the order Paramyxida Chatton, 1911. *Folia Parasitol.* 56, 73–85.
- Fernández Robledo, J.A., Vasta, G.R., Record, N.R., 2014. Protozoan parasites of bivalve molluscs: literature follows culture. *PLoS One* 9, e100872. doi:10.1371/journal.pone.0100872
- Fernandez-Robledo, J.A., Lin, Z., Vasta, G.R., 2008. Transfection of the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 44–53.
- Fernández-Robledo, J.A., Vasta, G.R., 2010. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 26, 244–254. doi:10.1016/j.pt.2010.02.004

- Ford, S.E., Chintala, M.M., 2006. Northward expansion of a marine parasite: Testing the role of temperature adaptation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 339, 226–235. doi:10.1016/j.jembe.2006.08.004
- Ford, S.E., Kanaley, S.A., Littlewood, D.T.J., 1993. Cellular Responses of Oysters Infected with *Haplosporidium nelsoni*: Changes in Circulating and Tissue-Infiltrating Hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 49–57. doi:10.1006/jipa.1993.1009
- Friedman, C.S., Brown, H.M., Ewing, T.W., Griffin, F.J., Cherr, G.N., 2005. Pilot study of the Olympia oyster *Ostrea conchaphila* in the San Francisco Bay estuary: description and distribution of diseases. *Dis. Aquat. Organ.* 65, 1–8.
- Gaillard, J., 2009. Contribution à l'étude de *Marteilia refringens* dans l'étang de Diana, Corse. Rapport de Master 2 Agro Campus Ouest ENSA3DAG. 111 p
- Gauthier, J.D., Vasta, G.R., 1995. *In vitro* culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*: Optimization of the methodology. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 156–168.
- Gervais, O., Renault, T., Chollet, B., Arzul, I., 2014. Modulation Of Apoptosis By Stress Factors Including The Protozoan Parasite *Bonamia Ostreae* In The Flat Oyster, *Ostrea edulis*. 106th Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, Jacksonville, USA
- Gombač, M., Kušar, D., Ocepek, M., Pogačnik, M., Arzul, I., Couraleau, Y., Jenčič, V., 2013. Marteiliosis in mussels: a rare disease? *J. Fish Dis.* n/a–n/a. doi:10.1111/jfd.12174
- Gonzalez, V., Combe, A., David, V., Malmquist, N.A., Delorme, V., Leroy, C., Blazquez, S., Ménard, R., Tardieux, I., 2009. Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host Microbe* 5, 259–272. doi:10.1016/j.chom.2009.01.011
- Grizel, H., 1985. Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Thèse Doctorat es Sciences, Montpellier, France.
- Grizel, H., Comps, M., Cousserans, F., Bonami, J.-R., Vago, C., 1974. Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *C. r. Académie Sci. Paris t.* 279, 783–785.
- Grizel, H., Comps, M., Raguene, D., Leborgne, Y., Tige, G., Martin, A.G., 1983. Results of the acclimatization experiments of *Ostrea chilensis* on the Brittany coasts. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* Nantes 46, 209–225.
- Grizel, H., Mialhe, E., Chagot, D., Boulo, V., Bachère, E., 1988. Bonamiasis : a model study of diseases in marine molluscs, in: Society, A.F. (Ed.), *Major Parasitic and Pathological Conditions*. pp. 1–4.
- Hahn, J.-S., 2009. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep.* 42, 623–630.
- Harrang, E., 2012. Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la caractérisation de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose, et pour la détection de signatures de la sélection naturelle. Thèse de doctorat universitaire, Université La Rochelle.
- Hershkovitz, M.A., Lewis, L.A., 1996. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1276–1295.
- Hervio, D., 1992. Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (ascetospora), protozoaire parasite de l'huître *Ostrea edulis* (bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de doctorat universitaire. Université Clermont Ferrand 2.
- Hervio, D., Bachère, E., Boulo, V., Cochenec, N., Vuillemin, V., Le Coguc, Y., Cailletaux, G., Mazurie, J., Mialhe, E., 1995. Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: Application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture* 132, 183–194.
- Hervio, D., Chagot, D., Godin, P., Grizel, H., Mialhe, E., 1991. Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Ascetospora), an intrahaemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Dis. Aquat. Organ.* 12, 67–70.

- Hill, K.M., Carnegie, R.B., Aloui-Bejaoui, N., El Gharsalli, R., White, D.M., Stokes, N.A., Burreson, E.M., 2010. Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 179–185.
- Hine, P.M., 1991. Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Organ.* 11, 163–171.
- Hine, P.M., Cochennec Laureau, N., Berthe, F.C.J., 2001. *Bonamia exitiosus* n. sp (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Dis. Aquat. Organ.* 47, 63–72.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P., Newborn, D., 1998. Prevention of population cycles by parasite removal. *Science* 282, 2256–2258.
- Hughes, F.M., Foster, B., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2010. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 247–257.
- Itoh, N., Momoyama, K., Ogawa, K., 2005. First report of three protozoan parasites (a haplosporidian, *Marteilia* sp. and *Marteilioides* sp.) from the Manila clam, *Venerupis (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. *J Invertebr Pathol* 88, 201–6.
- Kemp, W.M., Boynton, W.R., Adolf, J.E., Boesch, D.F., Boicourt, W.C., Brush, G., Cornwell, J.C., Fisher, T.R., Glibert, P.M., Hagy, J.D., Harding, L.W., Houde, E.D., Kimmel, D.G., Miller, W.D., Newell, R.I.E., Roman, M.R., Smith, E.M., Stevenson, J.C., 2005. Eutrophication of Chesapeake Bay: historical trends and ecological interactions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 303, 1–29. doi:10.3354/meps303001
- Kleeman, S.N., Adlard, R.D., Lester, R.J., 2002. Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. *Int J Parasitol* 32, 767–84.
- Kolev, N.G., Tschudi, C., Ullu, E., 2011. RNA Interference in Protozoan Parasites: Achievements and Challenges. *Eukaryot. Cell* 10, 1156–1163. doi:10.1128/EC.05114-11
- Kuris, A.M., Hechinger, R.F., Shaw, J.C., Whitney, K.L., Aguirre-Macedo, L., Boch, C.A., Dobson, A.P., Dunham, E.J., Fredensborg, B.L., Huspeni, T.C., Lorda, J., Mababa, L., Mancini, F.T., Mora, A.B., Pickering, M., Talhouk, N.L., Torchin, M.E., Lafferty, K.D., 2008. Ecosystem energetic implications of parasite and free-living biomass in three estuaries. *Nature* 454, 515–518. doi:10.1038/nature06970
- La Peyre, J.F., 1996. Propagation and in vitro studies of *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 15, 89–101.
- La Peyre, J.F., Faisal, M., Burreson, E.M., 1993. *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 304–310.
- Lallias, D., Gomez-Raya, L., Haley, C.S., Arzul, I., Heurtebise, S., Beaumont, A.R., Boudry, P., Lapègue, S., 2009. Combining two-stage testing and interval mapping strategies to detect QTL for resistance to bonamiosis in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Mar Biotechnol* 11, 570–584.
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A., Berthe, F. (1999) DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1, 588–597
- Le Roux, F., Lorenzo, G., Peyret, P., Audemard, C., Figueras, A., Vivares, C., Gouy, M., Berthe, F., 2001. Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J Eukaryot Microbiol* 48, 449–454.
- Lester, R.J.G., Davis, G.H.G., 1981. A New *Perkinsus* Species (Apicomplexa, Perkinsea) From the Abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* 37, 181–187.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1–37. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.05.027
- Longet, D., Burki, F., Flakowski, J., Berney, C., Polet, S., Fahrni, J., Pawlowski, J., 2004. Multigene evidence for close evolutionary relations between Gromia and Foraminifera. *Acta Protozool.* 303–311.

- Longshaw, M., Feist, S.W., Matthews, R.A., Figueras, A., 2001. Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Dis. Aquat. Organ.* 44, 137–142.
- Lonsdale, D.J., Cerrato, R.M., Caron, D.A., Schaffner, R.A., 2007. Zooplankton changes associated with grazing pressure of northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* L.) in experimental mesocosms. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 101–110. doi:10.1016/j.ecss.2006.12.014
- Lopez, C., Darriba, S., 2006. Presence of *Marteilia* sp. (Paramyxea) in the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 92, 109–111.
- Lopez-Flores, I., de la Herran, R., Garrido-Ramos, M.A., Navas, J.I., Ruiz-Rejon, C., Ruiz-Rejon, M., 2004. The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* 129, 411–419.
- Lopez-Flores, I., Garrido-Ramos, M.A., De la Herran, R., Ruiz-Rejon, C., Ruiz-Rejon, M.N., J.I., 2008a. Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. *Mol. Cell. Probes* 22, 151–155.
- Lopez-Flores, I., Robles, F., Valencia, J.M., Grau, A., Villalba, A., De la Herran, R., Garrido-Ramos, M.A., Ruiz Rejon, C., Ruiz Rejon, M., Navas, J.I., 2008b. Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridization in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Dis. Aquat. Org.* 82, 79–87.
- Lopez-Flores, I., Suarez-Santiago, V.N., Longet, D., Saulnier, D., Chollet, B., Arzul, I., 2007. Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. *Parasitology* 134, 1941–1948.
- Lüder, C.G., Campos-Salinas, J., Gonzalez-Rey, E., van Zandbergen, G., 2010. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. *Parasit. Vectors* 3, 116. doi:10.1186/1756-3305-3-116
- Lynch, S.A., Abollo, E., Ramillo, A., Cao, A., Culloty, S.C., Villalba, A., 2010. Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology* 137, 1515–1526.
- Mackin, J.G., Owen, H.M., Collier, A., 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* 111, 328–329.
- Marcogliese, D., 2005. Transmission of marine parasites, in: *Marine Parasitology*. Klaus Rohde, Eds CABI Publishing, pp. 280–286.
- Marcogliese, D.J., 1995. The role of zooplankton in the transmission of helminth parasites to fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 5, 336–371. doi:10.1007/BF00043006
- Marcogliese, D.J., 2002. Food webs and the transmission of parasites to marine fish. *Parasitology* 124, 83–99. doi:10.1017/S003118200200149X
- Marty, G., Bower, S., Clarke, K., Meyer, G., Lowe, G., Osborn, A., Chow, E., Hannah, H., Byrne, S., Sojonky, K., Robinson, J., 2006. Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture* 261, 33–42.
- Mauriz, O., Maneiro, V., Pérez-Parallé, M.L., Sánchez, J.L., Pazos, A.J., 2012. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies on the gonad of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. *Aquaculture* 370–371, 158–165. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.020
- McLaughlin, S.M., Elsayed, E.E., Faisal, M., 2000. Analysis of extracellular proteins of two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam *Mya arenaria* in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126, 587–598.
- McLaughlin, S.M., Faisal, M., 1999. A comparison of diagnostic assays for detection of *Perkinsus* spp. in the softshell clam *Mya arenaria*. *Aquaculture* 172, 197–204.
- Miahle, E., Bachere, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 71, 293–299.

- Michaeli, S., Doniger, T., Gupta, S.K., Wurtzel, O., Romano, M., Visnovezky, D., Sorek, R., Unger, R., Ullu, E., 2012. RNA-seq analysis of small RNPs in *Trypanosoma brucei* reveals a rich repertoire of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 40, 1282–1298. doi:10.1093/nar/gkr786
- Montes, J., Anadon, R., Azevedo, C., 1994. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 1–6.
- Montes, J., Longa, M.A., Lama, A., Guerra, A., 1998. Marteilliosis of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) reared in Galicia NW Spain. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 18, 124–126.
- Morga, B., 2010. Etude des interactions hôte/parasite chez l’huître plate *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*. Thèse de doctorat universitaire. Université La Rochelle
- Morga, B., Arzul, I., Chollet, B., Renault, T., 2009a. Infection with the protozoan *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 836–842.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Renault, T., 2010. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 937–945.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Segarra, A., Chollet, B., Renault, T., 2011. Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an *in vitro* infection with *Bonamia ostreae*. *Dev Comp Immunol* 35, 323–33.
- Morga, B., Arzul, I., Segarra, A., Faury, N., Chollet, B., Renault, T., 2009b. Modulation of gene expression in haemocytes from *Ostrea edulis* in response to an *in vitro* *Bonamia ostreae* infection. *J. Shellfish Res.* 28, 716.
- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Arzul, I., 2012. New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 958–68. doi: 10.1016/j.fsi.2012.01.026.
- Morton, N.E., 1955. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7, 277–318.
- Moss, J. A., Burreson, E. M. and Reece, K. S. (2006). Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research* 25, 65–72.
- Moss, J.A., Xiao, J., Dungan, C.F., Reece, K.S., 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in Oysters of Southern China. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 117–130.
- Mourton, C., Boulo, V., Chagot, D., Hervio, D., Bachere, E., Mialhe, E., Grizel, H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): *In vitro* system establishment. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 235–240.
- Murray, H.W., Nathan, C.F., Cohn, Z.A., 1980. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. IV. Role of endogenous scavengers of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 152, 1610–1624.
- Murrell, A., Kleeman, S.N., Barker, S.C., Lester, R.J.G., 2002. Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 22, 258–265.
- NaciriGraven, Y., Martin, A.G., Baud, J.P., Renault, T., Gerard, A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 224, 91–107.
- Narcisi, V., Arzul, I., Cargini, D., Mosca, F., Calzetta, A., Traversa, D., Robert, M., Joly, J.-P., Chollet, B., Renault, T., Tiscar, P.G., 2010. Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Org.* 89, 79–85.
- Neckers, L., Tatu, U., 2008. Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe* 4, 519–527. doi:10.1016/j.chom.2008.10.011
- Newell, R., 2004. Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: A review. *J. Shellfish Res.* 51–61.
- OIE, 2014. Accès en ligne: OIE - World Organisation for Animal Health [WWW Document]. URL <http://www.oie.int/fr/normes-internationales/code-aquatique/acces-en-ligne/> (accessed 7.15.14).

- Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J., 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* 4, 410–415. doi:10.1038/ni0503-410
- Ordas, M.C., Figueras, A., 1998. In vitro culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus*. *Dis. Aquat. Organ.* 33, 129–136.
- Oubella, R., Maes, P., Paillard, C., Auffret, M., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Organ.* 193–197.
- Pales-Espinosa, E., Corre, E., Allam, B., 2014. Pallial mucus of the oyster *Crassostrea virginica* regulates the expression of putative virulence genes of its pathogen *Perkinsus marinus*. *Int. J. Parasitol.* 44, 305–17. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.01.006.
- Pascual, M., Martin, A.G., Zampatti, E., Coatanea, D., Defosse, J., Robert, R., 1991. Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. *Int. Council. Explor. Sea C.M.* 1991/K:30, 17 pp.
- Pascual, S., Villalba, A., Abollo, E., Garcí, M., Gonzales, A.F., Nombela, M., Posada, D., Guerra, A., 2010. The mussel *Xenostrobus securis*: a well established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biol. Invasions* 12, 2091–2103.
- Pawlowski, J., Bolivar, I., Fahrni, J., Vargas, C. de, Bowser, S.S., 1999. Naked foraminiferans revealed. *Nature* 399, 27–27. doi:10.1038/19881
- Pecher, W.T., Alavi, M.R., Schott, E.J., Fernandez-Robledo, J.A., Roth, L., Berg, S.T., Vasta, G.R., 2008. Assessment of the Northern Distribution Range of Selected *Perkinsus* Species in Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) and Hard Clams (*Mercenaria mercenaria*) with the Use of PCR-Based Detection Assays. *J. Parasitol.* 94, 410–422. doi:10.1645/GE-1282.1
- Penketh, P.G., Kennedy, W.P., Patton, C.L., Sartorelli, A.C., 1987. Competent metabolic utilization of hydrogen peroxide by trypanosomes. *Acta Trop.* 44, 461–462.
- Perkins, F.O., 1976. Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens* - taxonomic implications. *J. Protozool.* 23, 64–74.
- Perkins, F.O., 1979. Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera *Minchinia*, *Urosporidium*, *haplosporidium* and *Marteilia* - Taxonomic implications. *Mar. Fish. Rev.* 41, 25–37.
- Perkins, F.O., Wolf, P.H., 1976. Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. N.- Haplosporidan pathogen of Australian oysters. *J. Parasitol.* 62, 528–538.
- Pichot, Y., Comps, M., Tige, G., Grizel, H., Rabouin, M.A., 1979. Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.* 43, 131–140.
- Plazzi, F., Ceregato, A., Taviani, M., Passamonti, M., 2011. A Molecular Phylogeny of Bivalve Mollusks: Ancient Radiations and Divergences as Revealed by Mitochondrial Genes. *PLoS ONE* 6, e27147. doi:10.1371/journal.pone.0027147
- Poder, M., Auffret, M., Balouet, G., 1983. (Pathological and epidemiological studies of parasitic diseases of *Ostrea edulis*: First results from a retrospective and comparative research of main species of molluscs in oyster farm in North Brittany.), in: *Bases Biologiques de l'Aquaculture. I F R E M E R Centre de Brest., Montpellier (France)*, pp. 125–138.
- Porter, E.T., Cornwell, J.C., Sanford, L.P., 2004. Effect of oysters *Crassostrea virginica* and bottom shear velocity on benthic-pelagic coupling and estuarine water quality. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 271, 61–75. doi:10.3354/meps271061
- Poulin, R., 2011. Uneven distribution of cryptic diversity among higher taxa of parasitic worms. *Biol. Lett.* 7, 241–244. doi:10.1098/rsbl.2010.0640
- Poulin, R., Combes, C., 1999. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol. Today Pers.* Ed 15, 474–475.
- Poulin, R., Morand, S., 2000. The Diversity of Parasites. *Q. Rev. Biol.* 75, 277–293.
- Prado-Alvarez, M., Chollet, B., Couraleau, Y., Morga, B., Arzul, I., 2013a. Heat Shock Protein 90 of *Bonamia ostreae*: Characterization and Possible correlation with infection of the flat oyster, *Ostrea edulis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, 257–266.

- Prado-Alvarez, M., Chollet, B., Faury, N., Robert, M., Morga, B., Ibara, D., Lupo, C., Renault, T., Arzul, I., 2013b. Interactions between *Ostrea edulis* galectin (OE-GAL) and the protozoan parasite *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunol.* 34, 1674–1674.
- Pratt, W.B., Toft, D.O., 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 228, 111–133.
- Reece, K.S., Bushek, D., Graves, J.E., 1997. Molecular markers for population genetic analysis of *Perkinsus marinus*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6, 197–206.
- Reece, K.S., Bureson, E.M., Dungan C.F., 2008. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *Dis. Aquat. Org.* 82, 237–248.
- Reece, K.S., Siddall, M.E., Stokes, N.A., Bureson, E.M., 2004. Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *J Parasitol* 90, 1111–22.
- Reece, S.E., Pollitt, L.C., Colegrave, N., Gardner, A., 2011. The meaning of death: evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. *PLoS Pathog.* 7, e1002320. doi:10.1371/journal.ppat.1002320
- Renault, T., Cochennec, N., Chollet, B., 1995a. Marteilliosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. *Dis. Aquat. Organ.* 23, 161–164.
- Renault, T., Cochennec, N., Grizel, H., 1995b. *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 15, 78–80.
- Riera, V., Santmarti, M., Durfort, M., 1993. Presence of *Marteilia refringens*, in the cultures of bivalve molluscs in the Catalan littoral. *Actas IV Congr. Nac Acuicult* 539–544.
- Robert, M., Garcia, C., Chollet, B., Lopez-Flores, I., Ferrand, S., François, C., Joly, J.-P., Arzul, I., 2009. Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mol. Cell. Probes* 23, 264–271.
- Robledo, J.A.F., Mialhe, E., Figueras, A., 1995. Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Asctospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Tech. Fish Immunol.* 4, 117–118.
- Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125–145. doi:10.1016/S0044-8486(98)00439-6
- Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate Immune Systems—Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific? *J. Immunol.* 179, 7209–7214. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7209
- Sato, S., Nieminen, J., 2004. Seeing strangers or announcing “danger”: galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj. J.* 19, 583–591. doi:10.1023/B:GLYC.0000014089.17121.cc
- Schulenburg, H., Boehnisch, C., Michiels, N.K., 2007. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol. Immunol.* 44, 3338–3344. doi:10.1016/j.molimm.2007.02.019
- Sheterline, P., Sparrow, J.C., 1994. Actin. *Protein Profile* 1, 1–121.
- Shrestha, S.P., Tomita, T., Weiss, L.M., Orlofsky, A., 2006. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. *Int. J. Parasitol.* 36, 433–441. doi:10.1016/j.ijpara.2006.01.006
- Siah, A., Dohoo, C., McKenna, P., Delaporte, M., Berthe, F.C.J., 2008. Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 202–207. doi:10.1016/j.fsi.2008.04.006
- Sokolova, I.M., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebr. Surviv. J.* 49–58.
- Sorber, K., Dimon, M.T., DeRisi, J.L., 2011. RNA-Seq analysis of splicing in *Plasmodium falciparum* uncovers new splice junctions, alternative splicing and splicing of antisense transcripts. *Nucleic Acids Res.* 39, 3820–3835. doi:10.1093/nar/gkq1223
- Tasumi, S., Vasta, G.R., 2007. A Galectin of Unique Domain Organization from Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Is a Receptor for the Protistan Parasite *Perkinsus marinus*. *J Immunol* 179, 3086–98.

- Van Banning P., 1990. The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 84, 189–192.
- Van Gils, J.A., Piersma, T., Dekinga, A., Spaans, B., Kraan, C., 2006. Shellfish Dredging Pushes a Flexible Avian Top Predator out of a Marine Protected Area. *PLoS Biol* 4, e376. doi:10.1371/journal.pbio.0040376
- Van Valen, L., 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1–30.
- Villalba, A., Iglesias, D., Ramilo, A., Darriba, S., Parada, J.M., No, E., Abollo, E., Molares, J., Carballal, M.J., 2014. Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochillia*. *Dis. Aquat. Organ.* 109, 55–80.
- Villalba, A., Lopez, M.C., Carballal, M.J., 1993a. Parasites and pathologic conditions of three clam species, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, and *Venerupis rhomboides*, in the Galician Rias. *Actas IV Congr. Nac Acuicult* 551–556.
- Villalba, A., Mourelle, S.G., Carballal, M.J., Lopez, M.C., 1993b. Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.* 17, 205–213.
- Villalba, A., Mourelle, S.G., Lopez, M.C., Carballal, M.J., Azevedo, C., 1993c. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). 1. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Organ.* 16, 61–72.
- Villalba, A., Reece, K.S., Camino Ordás, M., Casas, S.M., Figueras, A., 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.* 17, 411–432. doi:10.1051/alr:2004050
- Volety, A.K., Chu, F.-L.E., 1997. Acid phosphatase activity in *Perkinsus marinus*, the protistan parasite of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Parasitol.* 83, 1093–1098.
- Wang, Z., Jian, J., Lu, Y., Wang, B., Wu, Z., 2011. A tandem-repeat galectin involved in innate immune response of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Genomics* 4, 229–236. doi:10.1016/j.margen.2011.06.004
- Wiesgigl, M., Clos, J., 2001. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell* 12, 3307–3316.
- Williams, H., 2002. Parasitic Worms Of Fish. CRC Press.
- Wood, C.L., Byers, J.E., Cottingham, K.L., Altman, I., Donahue, M.J., Blakeslee, A.M.H., 2007. Parasites alter community structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9335–9339. doi:10.1073/pnas.0700062104
- Wu, M., Eisen, J.A., 2008. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biol.* 9, R151. doi:10.1186/gb-2008-9-10-r151
- Xiong, J., Lu, X., Zhou, Z., Chang, Y., Yuan, D., Tian, M., Zhou, Z., Wang, L., Fu, C., Orias, E., Miao, W., 2012. Transcriptome analysis of the model protozoan, *Tetrahymena thermophila*, using Deep RNA sequencing. *PLoS One* 7, e30630. doi:10.1371/journal.pone.0030630
- Yahara, I., 1999. The role of HSP90 in evolution. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 4, 375–379.
- Yoshino, T.P., Dinguirard, N., Kunert, J., Hokke, C.H., 2008. Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Gene* 411, 46–58. doi:10.1016/j.gene.2008.01.003
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu,

- X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zrncic, S., Le Roux, F., Oraic, D., Sostaric, B., Berthe, F.C., 2001. First record of *Marteilia* sp. in mussels *Mytilus galloprovincialis* in Croatia. *Aquat Organ* 44, 143–8.

CURRICULUM VITAE

Isabelle ARZUL

Née le 14/12/1973 (Quimper, 29)

2 enfants

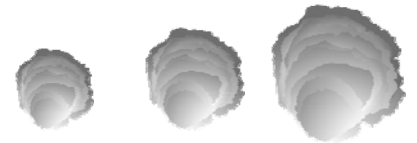
Adresse professionnelle : IFREMER,
17390 La Tremblade, France

Téléphone : 33 (0)5 46 76 26 10

Fax : 33 (0)5 46 76 26 11

✉ Isabelle.Arzul@ifremer.fr

Compétence



Pathologie des animaux aquatiques

Virologie et parasitologie des mollusques

Biologie moléculaire et cellulaire (PCR, RFLP, Real Time PCR, hybridation *in situ*, hybridation suppressive soustractive, séquençage, clonage, RNA seq, analyse de séquence, cytométrie en flux, microscopie optique, microscopie électronique à transmission)

Diagnostic des maladies des mollusques (histologie, hybridation *in situ*, microscopie électronique à transmission, PCR, Real Time PCR, séquençage)

Pathologie expérimentale

Coordination de projets

Expérience

Pathologiste impliquée en recherche sur la parasitologie des mollusques et coordonnatrice de la surveillance zosanitaire des maladies des mollusques (depuis 2002)

Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade, France

➤ **Activités de recherche en parasitologie des mollusques**

- Etudes épidémiologiques de la bonamiose et de la marteiliose, deux maladies parasitaires de l'huître plate, *Ostrea edulis*
- Etude de la variabilité moléculaire des parasites *Bonamia ostreae*, *Perkinsus olseni* et *Marteilia refringens* ; caractérisation de nouveaux isolats
- Essais de pathologie expérimentale pour préciser les spectres d'hôte et comprendre les cycles parasitaires de *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*.

- Optimisation et validation d'outils diagnostiques pour la détection de parasites des genres *Bonamia* and *Marteilia* (PCR, Real Time PCR, hybridation *in situ*, histologie, cytologie)
 - Etude des interactions hôte-pathogène en particulier dans le modèle huître plate *Ostrea edulis* et son parasite intracellulaire *Bonamia ostreae* : description de la réaction de l'hôte en réponse à une infection par biologie moléculaire (SSH, Real Time PCR) et biologie cellulaire (microscopie et cytométrie en flux)
 - Encadrement d'étudiants de différents niveaux dont des étudiants en thèse sur l'étude des interactions hôte pathogène chez le modèle *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*, co encadrement d'étudiants en thèse sur le parasite *Marteilia refringens* et notamment d'une étudiante espagnole
 - Coopération internationale (Australie, Argentine, Chili, Canada, Tunisie, Mexique, Corée, Maroc, Italie...)
- **Coordination du réseau national (REPAMO) pour la surveillance et le contrôle des maladies des mollusques le long des côtes françaises (2002-2004) et coordination du Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) pour les maladies des mollusques en Europe (depuis 2004) :**
- Définition des objectifs du REPAMO, puis, du LRUE, en fonction des obligations réglementaires et selon le contexte scientifique, épidémiologique et socio-économique.
 - Animation du réseau REPAMO, puis, du réseau des laboratoires de référence européens: organisation de réunions annuels, de workshops et communication avec les acteurs et partenaires des deux réseaux
 - Définition et application des programmes de surveillance de la santé des mollusques en France et en Europe
 - Harmonisation du diagnostic des maladies des mollusques au sein de l'Union Européenne : diagnostic confirmatoire, envoi de matériel de référence, organisation de tests de comparaison inter laboratoires
 - Formation : organisation de formations pour le diagnostic et la surveillance des maladies des mollusques
 - Expertises pour la Commission Européenne et l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale (experte OIE pour la marteillose et la bonamiose depuis 2004)
- **Participation à des projets régionaux**
- Implication dans le projet REMCO (Exploitation durable des ressources littorales marines corses), coordonné par le Laboratoire Environnement Ressources Provence Azur Corse -2006-2008
 - Implication dans le projet PERLE (Programme d'Expérimentation et de Recherche sur L'huître plate *Ostrea edulis*) Pôle Agronomique Ouest, Responsable d'un Sous-Programme de travail « Situation des populations naturelles vis-à-vis des maladies parasitaires (bonamiose et marteillose) »

➤ Participation à des projets européens

- Implication dans le comité de pilotage du projet européen PANDA (Permanent Advisory Network for Aquatic Diseases) et plus particulièrement dans le Workpackage sur le diagnostic - 2003-2007
- Implication dans le Workpackage "Review of disease interaction and pathogen exchange" du projet européen DIPNET (Disease Interactions and Pathogen exchange between farmed and wild aquatic animal populations – an European NETwork) - 2004-2005
- Implication dans le comité de pilotage du projet européen WOPER (Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry) - 2007
- Implication dans le montage du projet européen BIVALIFE -Management of infectious diseases in oysters and mussels in Europe-puis coordination du Workpackage "Pathogen control and eradication: development of methods, field tests and recommendations" – 2011-2014
- Participation au projet Interreg IV B SUDOE AQUAGENET Réseau transnational pour la biotechnologie en aquaculture. Participation au groupe de travail « *Biotechnologies appliquées aux agents pathogènes* » - 2011-2014

Microbiologiste moléculaire (2001-2002)

CIRAD-EMVT, Santé animale, Montpellier

Etude des mycoplasmes de ruminants : pleuropneumonies contagieuses bovine et caprine. Contribution au développement de vaccins et d'outils moléculaires.

1998 - 2001: thèse universitaire en virologie des bivalves

Université de Montpellier II

Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER

« Herpesvirus infectant les bivalves marins : détection, génome et transmission »

- Détection d'herpesvirus dans les bivalves par microscopie électronique à transmission, PCR, hybridation *in situ* et immuno histochimie.
- Essais de transmission expérimentale pour tester la sensibilité de différentes espèces de bivalve et la spécificité d'hôte du virus
- Analyse de séquences du génome viral par des techniques de biologie moléculaire : PCR, hybridation *in situ*, Southern blot, RFLP, clonage et séquençage de l'ADN viral.
- Enseignement de la biologie moléculaire (Cours théoriques et pratiques).

Formation

1998-2001 : Thèse en virologie

Ecole doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé, Formation doctorale Parasitologie, Université Montpellier II. 29 Novembre 2001.

1998 : Formation en virologie (3 mois)

Institut Pasteur, Paris.

Détection et isolement de virus. Identification par des techniques biochimiques, immunologiques et moléculaires.

1997-1998 : DEA d'Océanologie biologique

Université de Bretagne Occidentale, Brest.

1993-1997 : Etudes vétérinaires, spécialisation en aquaculture et pathologie en environnement aquatique

Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Formation continue

2002 : formation Access 2000 (4 jours)

Utilisation et Conception d'une Base de Données-SOFRAC pour le CIRAD, Montpellier, 22-25 avril 2002

2002 : formation « Auditeur Qualité Interne » (2 jours)

Par Jean-Paul Berthomé (Ifremer) à Ifremer Nantes (France)

2004 : école de biologie moléculaire (5 jours)

Par Frédérique Le Roux (Ifremer) à Banyuls (France)

2006 : formation en Real Time PCR (3 jours)

par Stratagene Europe à Ifremer La Tremblade (France)

2006 : formation en anglais (5 jours)

Anglais intensif par le CAREL à Royan (France)

2006: formation en épidémiologie (3 jours)

par Angus Cameron de AUSVET ANIMAL HEALTH SERVICES à Ifremer La Tremblade (France)

2006 : formation en épidémiologie (3 jours)

dans le contexte du projet Européen DIPNET séminaire organisé à l'université de Zaragoza (Espagne).

2007 : formation à la microscopie électronique à transmission (3 jours)

par Béatrice Burdin de « l'Université Claude Bernard, Lyon » à Ifremer La Tremblade (France)

2007 : formation en épidémiologie (3 jours)

par Angus Cameron de AUSVET ANIMAL HEALTH SERVICES à Ifremer La Tremblade (France)

2008 : formation à la phylogénie moléculaire (1 jour)

par la Station Biologique de Roscoff à Ifremer La Tremblade (France)

2009 : Réussir les écrits de la recherche et carte heuristique (5 jours)

Par DANAE Sciences à Ifremer La Tremblade (France)

2009 : formation en anglais (5 jours)

Anglais intensif par le CAREL à Royan (France)

2010 : formation à la bioinformatique et cytométrie en flux (5 jours)

dans le cadre de Lopdopp cost action training school–Alacala de Henares, Madrid, Espagne

2012 : Traitement des données avec le logiciel R (3 jours)

Par Agrocampus ouest à Ifremer La Tremblade

2012 : Initiation au logiciel SphinxQ (2 jours)

Par Sphinx Developpement à La Défense (France)

2013 : Initiation à l'utilisation de Galaxy (1 jour)

Par Laure Quintric, Ifremer Brest (France)

2013 : Initiation à l'utilisation de Galaxy (3 jours)

Plateforme Bioinfo GenoToul, Auzeville (France)

Activités d'enseignement

CNAM-Intechmer, Cherbourg (France), 2013-2014

- Cours “Maladies et Immunologie des Mollusques”, présentation de la surveillance des maladies, des principales maladies et de l’immunologie des mollusques (14 heures tous les ans)- 2^{ème} année IUT

ONIRIS, Nantes (France), 2010-2013

- Cours “Pathologie en aquaculture”, présentation de la surveillance des maladies des mollusques (2 à 3 heures tous les ans)- dans le cadre de l’option « aquaculture » proposée aux étudiants vétérinaires en cinquième (dernière) année d'étude

Agrocampus, Rennes (France), 2005-2013

- Cours “Pathologie en aquaculture”, présentation de la surveillance des maladies des mollusques (3 heures tous les ans)- Master 2 pro "Sciences Halieutiques et Aquacole"

Université des Sciences, la Rochelle (France), 1998-2009

- Cours en écologie (10 heures)- Licence “Biologie des populations et écologie générale »
- Cours et travaux pratiques de biologie moléculaire (94 heures)- Institut Universitaire de Technologie (IUT) de Génie Biologique
- Cours sur les Interactions hôtes-organismes pathogènes dans le cadre du Master 2 Approche Intégrée des Ecosystèmes Littoraux La Rochelle (2 heures)

Autres

- Workshops organisés tous les deux ans pour les laboratoires de référence pour les maladies mollusques en Europe

- Workshop sur les mollusques bivalves organisés pour les vétérinaires inspecteurs de la Commission Européenne à Grange, Irlande, 15-16 Janvier 2003
- Formation au diagnostic des maladies des mollusques pour des vétérinaires marocains 5 jours, Rabat, Maroc (Juillet 2004).
- Séminaire sur les réseaux en surveillance des maladies des animaux aquatiques Ljubljana, Slovenie, 10-11 Février 2005.
- Participation à un atelier sur la nouvelle Directive 2006/088/EC, Quarto d'Altino, Regione del Veneto, Italie, 25-26 Septembre 2008;
- Un séminaire « Personnes Ressources Produits de la pêche et Coquillages » organisé par l'Ecole Nationale des Services Vétérinaires. Pathologie des mollusques-18 novembre 2008 2 heures cours Formation Continue.
- Participation à un atelier sur la mise en oeuvre d'un système de surveillance des maladies des animaux aquatiques selon la Directive 2006/088/EC organisé par TAIEX en coopération avec les autorités croates, Zadar, Croatie, 6-7 Avril 2009
- Participation à un atelier sur l'application de la Directive 2006/088/EC organisé par el Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie en collaboration avec el Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Rome, Italie, 8-9 Novembre 2011

Activités d'encadrement

Post doctorants

Inmaculada Lopez-Flores (2005-2006) post doctorante espagnole (financement Région Andalousie). : Identification de gènes d'intérêt taxinomique chez les parasites *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*.

Maria Prado Alvarez (2009-2011) post doctorante espagnole (financement Ifremer et région Poitou-Charentes). Approche multi génique pour étudier la variabilité génétique et comparer la taxonomie des parasites du genre *Bonamia*.

Thèses

Noelia Carrasco (2004-2007) : "Noves aportacions al coneixement del cicle de vida del paràsit d'invertebrats marins *Marteilia refringens* (Paramyxea)", Universitat de Barcelona Facultat de Biologia. Co direction avec avec Dolors Furones (IRTA, Catalogne, Espagne) et Franck Berthe (Ifremer –LGP puis UPEI,Canada)

Benjamin Morga (2006-2010) : "Etude des interactions hôte/parasite chez l'huître plate *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*", Université de la Rochelle. Encadrement scientifique sous la direction de Tristan Renault (LGPM).

Pilar Comesana (2003-2008) : "Comparacion de parametros inmunologicos entre poblaciones de *Ostrea edulis* con diferente susceptibilidad a la bonamiosis y la especie resistente *Crassostrea gigas*", Universidade de Santiago de Compostela sous la direction d'Antonio Villalba. Encadrement d'un séjour de deux mois réalisé au laboratoire en 2006.

Estelle Harrang (2008-2012) : « Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la connaissance et l'amélioration de la résistance de l'huître plate à la bonamiose », Université de La Rochelle. Co encadrement scientifique avec Sylvie Lapègue (LGPM), direction Sylvie Lapègue.

Séverine Boyer (2009-2012) : « Ecologie et contribution du copépode *Paracartia grani* au cycle parasitaire du protozoaire *Marteilia refringens* dans l'étang de Thau. » Université de Montpellier.

Co encadrement scientifique avec Delphine Bonnet sous la direction de Marc Bouvy du Laboratoire ECOLAG (Ecosystèmes Lagunaires), UMR5119, Université Montpellier 2.

Ophélie Gervais (Depuis 2013) : « Etude cellulaire et moléculaire de l'apoptose chez l'huître plate *Ostrea edulis* et le parasite protozoaire intracellulaire *Bonamia ostreae* » Université de La Rochelle. Encadrement scientifique sous la direction de Tristan Renault (LGPM).

Thèse vétérinaire

Estelle Blanchet (2005) : « Bilan des connaissances actuelles, analyse des données collectées en France de 1989 à 2004, mesures de lutte et perspectives ». Co encadrement avec Laurence Miossec (LGP)

Master II

Benjamin Morga, (2006) : "Etude des interactions entre l'huître plate *Ostrea edulis* et le parasite *Bonamia ostreae* en cytométrie en flux et en hybridation soustractive suppressive ». Université de Corte (20).

Ophélie Gervais, (2013) : « Etude cellulaire de l'apoptose chez l'huître plate *Ostrea edulis* en réponse à *Bonamia ostreae* ». Université d'Orléans (45)

Ecole d'Ingénieur

Céline Bond, (2006) : « Etude de la viabilité du parasite *Bonamia ostreae*, agent de la bonamiose chez l'huître plate *Ostrea edulis*, en fonction des facteurs environnementaux (salinité, température, milieu) par cytométrie en flux ». Ecole d'Ingénieur en Agriculture, Esitpa (76)

Juliette Gaillard, (2009) : « Contribution à l'étude de *Marteilia refringens* dans l'Etang de Diana, Corse ».Agrocampus Ouest, ENSAR, Rennes (35).

Florence Bonvarlet (2011) : « Exigences réglementaires et recommandations concernant le traitement de l'eau en entrée et sortie d'écloseries conchyliques ». Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort, Maison Alfort, (94)

IUT, BTS

Rodolphe Dubois, (2003) « Contribution à la validation de la technique de PCR pour la détection du parasite *Bonamia ostreae* chez l'huître plate, *Ostrea edulis* » BTS, Lycée Jacques Bujault, Melle (79)

Damien Touzeau, (2005) « Contribution à la validation de la technique de PCR pour la détection du parasite *Bonamia ostreae* chez l'huître plate, *Ostrea edulis* » IUT, Option analyses biologiques et biochimiques, La Rochelle (17)

Clément Dupin, (2007) « Optimisation de la méthode de quantification de l'infection à *Bonamia ostreae* chez l'huître plate *Ostrea edulis* par PCR quantitative » IUT, Option analyses biologiques et biochimiques, La Rochelle (17)

Jean-Philippe Herbourg, (2008) « Contribution à l'étude de la dynamique du parasite *Marteilia refringens* chez les moules et les huîtres plates de l'étang de Diana ». IUT Nancy (54)

Justine Michel, (2008) « Caractérisation moléculaire du parasite du genre *Perkinsus* infectant les palourdes en France et étude du polymorphisme génétique en fonction de son origine géographique ». IUT Génie Biologique de Dijon (21)

Marie-Laure Dexideuil, (2010) « Développement d'une PCR Taqman multiplex pour la détection et le typage du parasite protozoaire *Marteilia refringens* ». IUT Génie Biologique de Dijon (21)

Dheliat Jesca Ibara, (2011). "Contribution à l'étude de la distribution du parasite *Bonamia Ostreae* dans son hôte l'huître plate, *Ostrea edulis* par Real time PCR » IUT Génie Biologique de Dijon (21)

Candice Wacrenier, (2012) « Etude de l'évolution de l'infection à *Bonamia ostreae* (protozoaire parasite de l'huître plate) dans les principaux sites de production d'huître plate en France. » BTSA Lycée Etienne Restat, Sainte-Livrade-sur-Lot (47)

Julie Dutarte, (2012) « Développement et validation de marqueurs microsatellites chez le parasite *Marteilia refringens* » Licence professionnelle, Spécialité Biotechnologie option Biologie moléculaire appliquée à la sécurité alimentaire Université de Pau et des pays de l'Adour, Mont de Marsan (40)

CDD Techniciens

Delphine Tourbiez, (2008) : Techniques de biologie moléculaire pour la caractérisation de gènes de *Bonamia ostreae* et la détermination de l'espèce des parasites du genre *Bonamia* détectés en France

Justine Michel, (2008) : Techniques de biologie moléculaire pour la caractérisation des parasites du genre *Perkinsus* et *Bonamia* présents en France

Sophie Lerond, (2009) : Techniques de biologie moléculaire (Real Time PCR et PCR-RFLP) pour la détection et quantification de *Bonamia ostreae* et la détection de *Marteilia refringens*.

Yann Couraleau (2012-2013) Étude de la variabilité de deux régions du génome de *Bonamia exitiosa* et développement d'une PCR en temps réel multiplex pour la détection de parasites des genres *Bonamia* et *Marteilia*

Julie Dutarte, (2012) Suivi par PCR des infections à *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* sur des cohortes d'huîtres plates *Ostrea edulis* dans le cadre du projet PERLE

Laury Baillon, (2013) Suivi par PCR des infections à *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* sur des cohortes d'huîtres plates *Ostrea edulis* dans le cadre du projet PERLE

Delphine Serpin (2013-2014) Comparaison de kits d'extraction d'ADN chez les fousseurs et contribution à la validation d'un essai de PCR en temps réel Taqman® multiplex pour la détection et le typage de *Marteilia refringens*.

Publications

Arzul I., T. Renault and C. Lipart. (2001). Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves : demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46 : 1-6.

- Arzul I., J.L. Nicolas, A.J. Davison and T. Renault. (2001). French scallops : a new host for ostreid herpesvirus 1. *Virology*, 290 : 342-349.
- Arzul I., T. Renault, C. Lipart and A. Davison. (2001). Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology*, 82 : 865-870.
- Arzul I. & Renault T. (2002) Herpèsvirus et bivalves marins. *Virologie*, 6 : 169-174
- Arzul I., T. Renault, A. Thébault and A. Gérard (2002) Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus research*, 84(1-2):151-60.
- Arzul I., Miossec L., Blanchet E., Garcia C., François C., Joly J-P. (2006). *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis* : a stable host-parasite system in France ? Symposia proceedings, ISVEE conference XI, Cairns, 6-11 August 2006, 5 p.
- Arzul I., Gagnaire B., Bond C., Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. and T. Renault. (2009) Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 85(1): 67-75
- Arzul I., 2009. Un laboratoire communautaire de référence pour les maladies des mollusques au coeur du Bassin Marennes-Oléron. Cahiers de la Référence –Journal électronique édité par l’Afssa. N°2 Décembre 2009
- Arzul I., Langlade A., Chollet B., Robert M., Ferrand S., Omnes E., Lerond S., Couraleau Y., Joly J.-P., François C., Garcia C. (2011) Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*?. *Veterinary Parasitology* 179: 69-76
- Arzul I., Chollet B., Michel J., Robert M., Garcia C., Joly J.P., François C., Miossec L. (2012) One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. *Parasitology*, doi:10.1017/S0031182012001047
- Arzul I., Chollet B., Boyer S., Gaillard J., Baldi Y., Robert M., Joly J.P., Garcia C., Bouchoucha M. (2013). Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology* <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182013001418>
- Bang Jensen B, NJ Olesen, I Arzul, GD Stentiford and E Brun. 2011 Challenges regarding implementation of the new legislation on Aquatic Animal Health Surveillance in Europe. 2011 *Epidémiol. et santé anim.*, 59-60 :266-268
- Boyer S. , Arzul I., Bonnet D. 2012 Some like it hot: *Paracartia grani* (Copepoda: Calanoida) arrival in the Thau lagoon (South of France- Mediterranean Sea). *Marine Biodiversity records* doi:10.1017/S1755267212000565.
- Boyer S., Chollet B., Bonnet D., Arzul I. (2013). New evidence for the involvement of *Paracartia grani* (Copepoda, 4 Calanoida) in the life cycle of *Marteilia refringens* (Paramyxia). *International Journal for Parasitology*, 43(14), 1089-1099.
- Batista F.M., I. Arzul, J.F. Pépin, F. Ruano, C.S. Friedman, P. Boudry and T. Renault (2007) Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: a critical review. *Journal of Virological Methods*, 139(1):1-11
- Carrasco N., I. Arzul, F.C.J. Berthe, M. Fernández-Tejedor, M. Durfort and M. Furones (2008) Delta de l’Ebre is a natural bay model for the study of *Marteilia* spp. (Paramyxia) life cycle and dynamics. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79: 65-73

- Carrasco N., Arzul I., Chollet B., Robert M., Joly J.P., Furones M.D. and F C J Berthe (2008) Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *Marteilia maurini*. *Journal of Fish Diseases* 31, 497–504
- Carrasco N., I. López-Flores, M. Alcaraz, M.D. Furones, F.C.J. Berthe and I. Arzul (2007) First record of a *Marteilia* parasite (Paramyxea) in zooplankton populations from a natural estuarine environment. *Aquaculture*, 269:63-70.
- Carrasco N., I. López-Flores, M. Alcaraz, M.D. Furones, F.C.J. Berthe and I. Arzul (2007) Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology*, 134(11):1541-1550
- Carrasco N., I. Arzul, F.C.J. Berthe and M.D. Furones (2007) *In situ* hybridization detection of *Marteilia refringens* (Paramyxea) initial infective stages in its host *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Fish Diseases* 31: 153-157
- Comesaña P., Casas SM, Cao A, Abollo E, Arzul I, Morga B, Villalba A. 2012 Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate pathology* : 109 : 274-286
- Corbeil S, Arzul I, Robert M, Berthe FC, Besnard-Cochennec N, Crane MSJ. (2006) Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis Aquat Organ*. 71(1):81-5.
- Corbeil S, Arzul I, Diggles B, Heasman M, Chollet B, Berthe FCJ, Crane MSJ. (2006) Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71(1):75-80.
- Elgharsalli R., Aloui-Bejaoui N., Salah H., Chollet B., Joly J.-P., Robert M., Couraleau Y., Arzul I.(2013) Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, *Journal of Invertebrate Pathology*, 112:175-183,
- Escobedo-Fregoso, C., Arzul, I., Carrasco, N., Gutiérrez-Rivera, J. N., Llera-Herrera, R. and Vázquez-Juárez, R. (2013), Polymorphism at the ITS and NTS Loci of *Perkinsus marinus* Isolated from Cultivated Oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and Phylogentic Relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi: 10.1111/tbed.12090
- François C., Garcia C., Miossec L., Joly J.-P., Lupo C., Chollet B., Robert M., Omnes E., Arzul I. (2011) REPAMO: A French network for the surveillance of mollusc health. *Epidémiol. et santé anim.* 59-60, 386-388
- Garcia C, Robert M, Arzul I, Chollet B, JolyJP, Miossec L, Comtet T, Berthe F. (2006) Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France: from occasional records to diseases emergence? *Diseases of Aquatic Organisms*, 70(3):193-9.
- Garcia C., Thebault A., Degremont L., Arzul I., Miossec L., Robert M., Chollet B., Francois C., Joly J.-P., Ferrand S., Kerdudou N., Renault T. (2011). Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary Research*, 42(73), 11 p
- Gombac M., Sitar R., Pogacnik M., Arzul I., Jencic V. (2013). Haemocytic neoplasia in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Slovene Adriatic Sea. *Marine And Freshwater Behaviour And Physiology*, 46(2), 135-143.
- Gombac M., Kusar D., Ocepek M., Pogacnik M., Arzul I., Couraleau Y., Jencic V. (2013) Marteiliosis in mussels: a rare disease? *Journal of Fish Diseases* <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12174>
- Hwang J. Y., Park J. J., Yu H. J., Hur Y. B., Arzul I., Couraleau Y., Park M. A. (2013). Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *Journal Of Fish Diseases*, 36(11), 969-972.

- Lallias D., Arzul I., Heurtebise S., Ferrand S., Chollet B., Robert M., Beaumont A.R., Boudry P., Morga B. and S. Lapègue (2008) *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources* 21 :423-439.
- Lallias D., Gomez-Raya L., Haley C.S., Arzul I., Heurtebise S., Beaumont A.R., Boudry B. and S. Lapègue (2009) Combining two-stage testing and interval mapping strategies to detect QTL for resistance to bonamiosis in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biotechnology*. 11:570-584
- Lorenzon S., I. Arzul, A. Peyraud, P. Hendrikx & F. Thiaucourt (2003). Molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia by multilocus sequence analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* biotype SC strains. *Veterinary Microbiology*, 93 : 319-333
- Lupo C., François C., Arzul I., Garcia C., Joly J.-P. Renault T. (2012) Défis de la surveillance des maladies chez les coquillages marins en France. *Epidémiol. et santé anim.*, 61 :27-42
- Miossec L., Garcia C., Arzul I., François C, Joly J-P, Chollet B. Robet M., De Blas I. 2006. Infection of *Perkinsus olseni* in clams as an example of the new French surveillance programme. Symposia proceedings, ISVEE conference XI, Cairns, 6-11 August 2006, 4 p.
- Morga B., Arzul I., Chollet B. and T. Renault. (2009) Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(6) : 836-842.
- Morga B., Arzul I., Faury N., Renault T. (2010) Identification of Genes From Flat Oyster *Ostrea Edulis* As Suitable Housekeeping Genes For Quantitative Real Time PCR. *Fish and Shellfish Immunology* 29(6):937-945.
- Morga B., Renault T., Faury N., Chollet B., Arzul I. (2011) Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during in vitro infection by the parasite *Bonamia ostreae*. *International Journal of Parasitology* 41: 755-764.
- Morga B, Arzul I, Faury N, Segarra A, Chollet B, Renault. T. 2010. Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an in vitro infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental and Comparative Immunology* 35 :323-333
- Morga B., Renault T., Faury N., Arzul I 2012. New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *International Fish and Shellfish Immunology*. 32: 958-968
- Prado-Alvarez M., Chollet B., Couraleau Y., Morga B., Arzul I. (2013). Heat shock protein 90 of *Bonamia ostreae*: characterization and possible correlation with infection of the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(3), 257-266.
- Narcisi V., Arzul I., Cargini D., Mosca F., Calzetta A., Traversa D., Robert M., Joly J. P., Chollet B., Renault T., Tiscar P. G. (2010) Detection of *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Diseases of Aquatic Organisms*. 89:79-85
- Renault T. and I. Arzul. (2001). Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe : Specific viral DNA detection by PCR. *Journal of Fish Diseases*, 24 : 161-167.
- Renault T., C. Lipart and I. Arzul. (2001). A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species : virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45 : 1-7.
- Renault T., C. Lipart and I. Arzul. (2001). A herpes-like virus infects *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*, 24 : 369-376.
- Renault T., I. Arzul and C. Lipart(2004) Development and use of an internal standard for oyster herpesvirus 1 detection by PCR. *Journal of Virological Methods*. 121(1):17-23.

Robert M., Garcia C., Chollet B., Lopez-Flores I., Ferrand S., François C., Joly J.-P and Arzul I. (2009) Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular and Cellular probes*, 23 : 264–271

Saulnier D., Reynaud Y., Arzul I., Miossec L., Le Roux F. & C. Goarant (2007). Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole : quelques scénarios illustrés d'exemples. *INRA Prod. Animal* 20 : 207-212

Segarra A., Pépin J.F., Arzul I., Morga B., Faury N., Renault T (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153: 92–99

Résumés de présentations lors de colloques internationaux publiés dans des journaux

Arzul I., Herbourg JP, Chollet B., Robert M., Joly JP., Garcia C. & M. Bouchouca, (2009). Marteilliosis development in two bivalve species in Diana lagoon (Corsica, France). *Journal of Shellfish Research* 28(3) : 680 (abstract).

Arzul I., Gaillard J., Lerond S., Chollet B., Robert M., Joly J.-P., Garcia C., Bouchouca M. (2010) An integrated study of marteilliosis in Diana lagoon (Corsica, France). (abstract) *Journal of shellfish research* 30(2): 482

Arzul I., Langlade A., Chollet B., Robert M., Omnes E., Lerond S., Joly J.-P., François C., Garcia C. (2010) Detection of *Bonamia ostreae* in larvae of *Ostrea edulis*. (abstract) *Journal of shellfish research* 30(2): 483

Arzul I., Aranguren R., Arcangeli G., Chesslett D., Couraleau Y., Engelsma M., Figueras A., Garcia C., Geoghegan F., Magnabosco C., Stone D. (2011) Distribution and variability of *Bonamia exitiosa* in flat oyster *Ostrea edulis* populations in Europe. (abstract) *Journal of shellfish research* 31(1): 300

Garcia C., I. Arzul, F. Berthe, B. Chollet, J.-P. Joly, N. Kerdudou, L. Miossec, M. Robert & J. L. Nicolas (2003). Potential pathogens associated with abnormal mortalities. *Journal of Shellfish Research* 22(1) : 331 (abstract)

Garcia C., I. Arzul, B. Chollet, S. Ferrand, C. François, J.-P. Joly, L. Miossec, & M. Robert. (2006) Synthesis of 15 years records for *Haplosporidium nelsoni* in *Crassostrea gigas* in France. *Journal of Shellfish Research* 25(2): 728 (abstract)

Lopez-Flores I., Robert M., Suarez-Santiago V.N., Longet D., Saulnier D., Chollet B. & I. Arzul, 2008: Actine genes in *Bonamia ostreae* : characterization, application to phylogeny and to diagnostic. *Journal of Shellfish Research* 27(4) : 1024 (abstract).

Morga B., Arzul I., Faury N. & T. Renault, 2008. Identification of genes expressed during an *in vitro* infection of haemocytes from *Ostrea edulis* with parasites *Bonamia ostreae*. *Journal of Shellfish Research* 27(4) : 1034 (abstract).

Morga B., Arzul I., Segarra A., Faury N., Chollet B & T; Renault, 2009. Modulation of gene expression in haemocytes from *Ostrea edulis* in response to an *in vitro* *Bonamia ostreae* infection. *Journal of Shellfish Research* (abstract) 28(3) : 716

Prado-Alvarez M., Chollet B., Faury N., Robert M., Morga B., Ibara D. J., Lupo C., Renault T., Arzul I. (2011) . Interactions between *Ostrea edulis* galectin (Oe-Gal) and the protozoan parasite *Bonamia ostreae*. (abstract) *Journal of shellfish research* 31(1): 334

Ouvrages ou articles de synthèse dans ouvrages

Thébault A. & Arzul I. (2005). Le REPAMO en France (pathologie des coquillages). Dans: La surveillance épidémiologique en santé animale, Auteurs Dufour B., Hendrikx P. Editeurs Cirad et AEEMA

Arzul I., Garcia C. & R. Leite, (2008). Roundtable of the session "Parasites of the genus *Perkinsus*". In Workshop for the analysis of the impact of perkinsosis to the European shellfish industry. Villalba A. (ed), pp 40-42

Garcia C., Leite R. & I. Arzul, (2008). Parasites of the genus *Perkinsus*. In Workshop for the analysis of the impact of perkinsosis to the European shellfish industry. Villalba A. (ed), pp 17-31

Arzul I., (2009). Rédaction des cinq chapitres suivant pour le Manuel aquatique OIE 2009: Infection à *Bonamia ostreae* ; Infection à *Bonamia exitiosa* ; Infection à *Mikrocytos/Bonamia roughleyi* ; Infection à *Marteilia refringens* ; Infection à *Marteilia sydneyi*

Arzul I., (2011). Rédaction des trois chapitres suivant pour le Manuel aquatique OIE 2011: Infection à *Bonamia ostreae* ; Infection à *Bonamia exitiosa* ; Infection à *Marteilia refringens*

Rapports

Arzul I. & M. Bouchoucha, (2007) Contribution à l'étude de *Marteilia refringens* dans la lagune de Diana. Rapport définitif Contrat n°06/3210905/F- 26 p.

Arzul I. and M. Bouchoucha. (2007). Etude de la résistance de la population d'huîtres plates *Ostrea edulis* dans l'étang de Diana au parasite *Bonamia ostreae*. Rapport intermédiaire Contrat n° 06/3210902/F – 15 p.

Arzul I. & M. Bouchoucha, (2008) Etude de la résistance de la population d'huîtres plates *Ostrea edulis* dans l'étang de Diana au parasite *Bonamia ostreae*. Rapport définitif Contrat n°06/3210902/F - 15 p.

Haenen O., Dalsgaard I., Bonami J. .R., Joly J. P., Olesen N. O., Jensen B. B., Ariel E., Miossec L. & I. Arzul, 2007. Report on the current best methods for rapid and accurate detection of the main disease hazards and requirements for improvements and their eventual standardisation and validation. PANDA report (Permanent network to strengthen expertise on infectious disease of aquaculture species and scientific advice to EU policy) : 131 p.

Nicolas J. L., Renault T., Arzul I., Gagnaire B., Garcia C., Le Roux F., Miossec L., Pépin J. F. & D. Saulnier, 2006. Rapport final Morest. Synthèse du thème 6. Caractérisation des mortalités de *C. gigas* dans leurs écosystèmes. Effet des agents pathogènes. La Rochelle 14-15 mars 2006.

Préparation, rédaction et diffusion des rapports suivants:

Bilan 2003 du réseau REPAMO (Réseau national de surveillance zoosanitaire des mollusques marins).

Technical Reports from the Community/EU Reference Laboratory for Molluscs Diseases 2002 à 2014 (= 13 rapports)

Reports from the Annual Meetings and Technical Workshops of the National Reference Laboratories for Mollusc Diseases 2002 à 2014 (= 13 rapports)

Rapports annuels des activités du laboratoire de référence OIE pour les infections à *Marteilia refringens* et *M. sydneyi* 2007 à 2013 (= 7 rapports)

Rapports annuels des activités du laboratoire de référence OIE pour les infections à *Bonamia ostreae* et *B. exitiosa* 2007 à 2013 (= 7 rapports)

Rapport réalisé pour l'évaluation du Laboratoire Communautaire de Référence pour les maladies des Mollusques. (visite de 2 évaluateurs le 25 mai 2009) 96 p

Reports to the European Commission on the interlaboratory comparison tests n° 2010-ILC-01; 2011-ILC-01; 2012-ILC-01

Contribution à la rédaction des rapports suivants :

Bilans du réseau REPAMO (Réseau national de surveillance des maladies des mollusques marins). 2005 à 2012 (= 8 rapports)

Rapports annuels du Laboratoire National de Référence pour les maladies des mollusques marins. 2011 à 2013 (= 3 rapports)

Colloques, congrès, tables rondes et posters

Je n'ai repris ci-après que les communications que j'avais personnellement réalisées ou représentées lors de conférences internationales. Par ailleurs, j'ai réalisé plus de 50 présentations lors de réunions annuelles des LNRs pour les maladies des mollusques, des réunions annuelles du REPAMO ou de séminaires IFREMER.

Arzul I., Le Deuff R.-M., Stone D., Thiéry R., Davison A and Renault T. (2003) Polymorphism in marine bivalve herpesviruses, Communication orale. 11th International Conference of the EAAP, 21-26 Septembre 2003, Malta

Arzul I., J.-P. Joly, M. Robert, B. Chollet, C. Garcia, L. Miossec, N. Cochenec, N. Carrasco, J. Campalans, M. Campalans & F. Berthe, (2005). Microcells in flat oysters, *Ostrea chilensis* from Chiloe island, Chile : a new *Bonamia* species ? Communication orale. 97th Annual Meeting National Shellfisheries Association, April 10-14, 2005, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

Arzul I., B. Chollet, C. Garcia, M. Robert, J.-P. Joly, L. Miossec & F. Berthe, (2005). *Ostrea Concapilla* : A Natural Host Of *Bonamia Ostreae* ? Communication affichée. 97th Annual Meeting National Shellfisheries Association, April 10-14, 2005, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

Arzul I., B. Hill & E. Ariel, (2005). Permanent Advisory Network for Diseases in Aquaculture (PANDA) Communication affichée. 97th Annual Meeting National Shellfisheries Association, April 10-14, 2005, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

Arzul I., Miossec L., Blanchet E., Garcia C., Joly J.P., Francois C. & F. Berthe, (2005) A long term study of bonamiosis in Quiberon bay, South Brittany, France. Communication orale. 8th International Conference on Shellfish Restoration, 2-5 October 2005, Brest, France.

Arzul I., A. Cook, B. Hill & E. Ariel, (2005). Permanent Advisory Network for Diseases in Aquaculture (PANDA) Communication affichée. 8th International Conference on Shellfish Restoration, 2-5 October 2005, Brest, France.

Arzul I, (2005). Bonamiosis in France: a 25 year story. Communication orale. Workshop organisé par the Foyle Carlingford and Irish Lights Commission or Loughs Agency "Living with Bonamia in Flat oyster Fishery. 24 September 2005.

Arzul I., (2005). Microcells in flat oysters, *Ostrea chilensis* and *Ostrea puelchana* from Chile and Argentina respectively : new bonamia species. Communication orale. 3rd Meeting of the Microcell Working Group Virginia Institute of Marine Science, . 15-17 April 2005, Gloucester Point, Virginia, U.S.A.

Arzul I; (2005). National Reference Laboratory network for Mollusc Diseases. Communication orale. Seminar "Networking on Aquatic Animal Health in Adriatic Countries" Organised in co-operation with Institute for Health Care and Breeding of Wild Animals, Fishes and Bees Veterinary Faculty, 10 february 2005, University of Ljubljana, Slovenia.

Arzul I., L. Miossec, C. Garcia, J.P. Joly, C. Francois, (2006). Pathogen exchanges between wild and cultivated mollusc species. Communication orale, Atelier de travail projet Européen DIPNET: April 3-4 2006, Prague, République Tchèque

Arzul I., L. Miossec, E. Blanchet, C. Garcia, C. François, J-P. Joly, (2006). Les réseaux de surveillance : surveiller mais également modéliser ? Exemple de la bonamiose affectant l'huître plate *Ostrea edulis*. Communication orale, Colloque santé aquacole, 13-14 juin 2006, ENVN, Nantes, France.

Arzul I., L. Miossec, E. Blanchet, C. Garcia, C. François, J-P. Joly, (2006). *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis*: A Stable Host-Parasite System in France? Communication orale, XI International Symposium for Veterinary Epidemiology and Economics, 6 - 11 August 2006, Cairns, Queensland, Australia.

Arzul I., L. Miossec, E. Blanchet, C. Garcia, C. François, J-P. Joly. (2006). *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis*: A Stable Host-Parasite System in France? Communication orale, International Workshop on summer mortality of marine shellfish. 11-14 octobre 2006, Busan, Corée.

Arzul I., C. Garcia, C. François, L. Miossec, J.-P. Joly, B. Chollet, M. Robert and S. Ferrand. (2006). Organisation of the surveillance of mollusc diseases at European and French levels: a risk based approach. International. Communication orale, Workshop on summer mortality of marine shellfish. 11-14 octobre 2006, Busan, Corée.

Arzul I., C. Garcia, L. Miossec, B. Chollet, C. François, J.P. Joly, J. F. Pepin, M. Robert & T. Renault, (2006). Herpes-like viruses and herpesviruses infecting molluscs. Communication orale, International Workshop on summer mortality of marine shellfish. 11-14 octobre 2006, Busan, Corée.

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

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

Arzul I., (2007) EU Community Reference Laboratory for Mollusc Diseases- Communication orale, Final PANDA Workshop 'Progress report and future perspectives' - Cefas Weymouth 18 to 21st of March 2007, Weymouth, United Kingdom

Arzul I., (2007) *Bonamia exitiosa* : an exotic pathogen to European mollusc stocks?- Communication orale, Working group meeting on aquatic animal health DG Sanco –3 décembre 2007 Commission Européenne Brussels, Belgique

Arzul I., (2008). Directive 2006/88/EC : a tool for the control and enhancement of general health status in mollusc farming. Communication orale, Workshop on the Directive 2006/088/EC, 25-26 September 2008- Quarto d'Altino (VE) Italy

Arzul I, Lopez-Flores I., Robert M., Suarez-Santiago V., Longet D., Saulnier D., Chollet B., (2008). Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and application to phylogeny and diagnostic. Communication orale, Microcell workshop, 20-21 mars 2008, La Tremblade, France

Arzul I., (2008). Des outils diagnostiques pour une meilleure santé des animaux aquatiques: de leur développement à leur utilisation dans un contexte de surveillance. Communication orale, Colloque Impact des organismes pathogènes et des micropolluants sur l'état de santé des poissons, mollusques et crustacés des milieux naturels : de l'individu au peuplement, 11-12 mars 2008, Ifremer, Nantes.

Arzul I., Bond C., Gagnaire B., Morga B., Chollet B., Ferrand S., Robert M. and Tristan Renault. (2008). Impact of environmental parameters including salinity and temperature on *Bonamia ostreae* prevalence and survival. Communication orale, Microcell workshop, 20-21 mars 2008, La Tremblade, France

Arzul I., Michel J., Chollet B., Robert M., Miossec L., Garcia C. & C. François, (2009). Molecular characterization of parasites of the genus *Perkinsus* present in clams from French producing areas. Communication orale, 101st Annual Meeting National Shellfisheries Association, March 22-26 2009, Savannah, Georgia, U.S.A.

Arzul I., Herboung J. P., Chollet B., Robert M., Joly J. P., Garcia C. & M. Bouchoucha, (2009). Marteiliosis development in two bivalve species in Diana lagoon (Corsica, France). Communication orale, 101st Annual Meeting National Shellfisheries Association, March 22-26 2009, Savannah, Georgia, U.S.A.

Arzul I., Robert M., Chollet B., Haffner P. & C. Garcia, (2009). Validation of diagnostic technique: example of the PCR for the detection of *Bonamia ostreae*. Communication orale, EAAP, 14-18 septembre 2009, Prague, République Tchèque

Arzul I., Robert M., Garcia C., Chollet B. & A. Langlade, (2009). Can *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis* ? Communication orale, EAAP, 14-18 septembre 2009, Prague, République Tchèque

Arzul I., Omnes E., Robert M., Chollet B., Joly J.-P., Miossec L., François C., Garcia C. (2010) Distribution of *Bonamia exitiosa* in flat oyster *Ostrea edulis* populations in France. Communication orale. Aquaculture 2010. 1-5 March 2010. San Diego, California, U.S.A.

Arzul I., Chollet B., Michel J., Robert M., Miossec L., Joly J.-P., François C., Garcia C. (2010) *Perkinsus olseni* and a new *Perkinsus* sp., closed to *P. Chesapeakei*, sympatric in clams *Ruditapes decussatus* from Leucate lagoon, France. Communication orale. Aquaculture 2010. 1-5 March 2010. San Diego, California, U.S.A.

Arzul I., Morga B., Faury N., Chollet B., Renault T. (2011). New insight into the resistance of flat oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. 1st Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health 5 - 8 July, 2011, Cairns Australia

Arzul I., Langlade A., Chollet B., Robert M., Omnes E., Lerond S., Joly J.-P., François C., Garcia C. (2011) Detection of *Bonamia ostreae* in larvae of *Ostrea edulis*. Communication orale 103rd annual meeting National shellfisheries Association 2011 March 27-31. Baltimore, Maryland, U.S.A.

Arzul I., Aranguren R. , Arcangeli G. , Chesslett D., Couraleau Y., Engelsma M., Figueras A. , Garcia C., Geoghegan F., Magnabosco C., Stone D. (2012) Distribution and variability of *Bonamia exitiosa* in flat oyster *Ostrea edulis* populations in Europe. Communication orale. 104th Annual Meeting National shellfisheries Association 2012 March 24-29. Seattle, Washington, U.S.A.

- Arzul I., Aranguren R., Arcangeli G., Chesslett D., Couraleau Y., Engelsma M., Figueras A., Garcia C., Geoghegan F., Magnabosco C., Stone D. (2012) Distribution and variability of *Bonamia exitiosa* in flat oyster *Ostrea edulis* populations in Europe. Communication orale. 5th Meeting of the Microcell Working Group Central, 9-10 February 2012 Veterinary Institute, Lelystad, the Netherlands.
- Arzul I. (2013) Mollusc diseases of significance in EU and their diagnosis. Communication orale. Workshop on "Mollusc Disease Diagnosis" 21-24 October 2013, Geelong, Australia.
- Arzul I. (2013) Proficiency testing activities for mollusk diagnostics in EU. Communication orale. Workshop on "Mollusc Disease Diagnosis" 21-24 October 2013, Geelong, Australia.
- Arzul I., M. Robert, S. Ferrand, B. Chollet, Y. Couraleau, D. J. Ibara, E. Omnes J.-P. Joly and C. Garcia (2013) Distribution of the parasite *Bonamia ostreae* inside its host, the flat oyster *Ostrea edulis*. Communication orale. EAAP 16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 2 – 6 September 2013, Tampere, Finlande
- Arzul I, Sierra R, Chollet B, Pawloski J, C Klopp. (2013) RNA seq for the identification of new sequences from *Bonamia ostreae*, a protozoan infecting flat oysters. Communication orale. Seminar Aquagenet: AQUAGENET, cooperation and biotechnology for a sustainable aquaculture in SUDOE region. 28 November 2013. IFAPA centro El Toruño. Junta de Andalucía, Espagne
- Boyer S., B. Chollet, M. Robert, M. Cuny, B. Moiroud, D. Bonnet and I. Arzul (2013). New evidences of *Paracartia grani* (copepoda, calanoida) involvement in *Marteilia refringens* (paramyxia) life cycle. Communication orale. EAAP 16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 2 – 6 September 2013, Tampere, Finlande
- Carrasco N, Hine PM, Durfort M, Andree K.B, Malchus N. Arzul I*, Lacuesta B, M. González, A. Roque, C. Rodgers and M.D. Furones. (2013) *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters. Communication orale. EAAP 16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 2 – 6 September 2013, Tampere, Finlande
- Garcia C., Arzul I., Chollet B., François C., Joly J.-P., Miossec L., M. Robert & T. Renault, (2006). Typology of oyster spat mortalities associated with OsHV-1 detection. International Workshop on Summer Mortality of Marine Shellfish, Tongyeong, Korea, 11-14 October 2006.
- Garcia C., I. Arzul, L. Miossec, B. Chollet, C. François, J.P. Joly, M. Robert, T. Renault, (2006). *Crassostrea gigas* spat mortalities and oyster herpesvirus detection in France Surveillance data from 1997 to 2005. International Workshop on summer mortality of marine shellsfish. 11-14 octobre 2006, Busan, Corée
- Garcia C., Arzul I., Robert M., Chollet B., Joly J. P., Miossec L. & C. François, (2009). Detection of atypical *Marteilia refringens* in mussels, *Mytilus edulis* in France. 101st Annual Meeting National Shellfisheries Association (NSA), Savannah, Georgia, March 22-26, 2009.
- Garcia C., Arzul I., Chollet B., Robert M., Omnes E., Ferrand S., Faury N., Tourbiez D., Haffner P., Miossec L., Joly J.-P., Francois C. (2011) Summer mortality outbreaks of French Pacific oysters, *Crassostrea gigas* since 2008: Results of the REPAMO network surveillance. Communication orale 103rd annual meeting National shellfisheries Association 2011 March 27-31, Baltimore, Maryland, U.S.A.
- Kroeck M.A., Arzul I., Robert M. & N. Carrasco, (2005). Detection of *Bonamia* sp., infecting flat oysters, *Ostrea Puelchana* (D'orbigny, 1842) in San Matías Gulf (Nw Patagonia, Argentina.) based on 18s small sub-unit and Its segment sequence. Communication affichée. 12th International Conference on Fish and Shellfish Pathology, 11-16 September 2005, Copenhagen, Denmark,
- Lopez-Flores I., Robert M., Suarez-Santiago V.N., Longet D., Saulnier D., Chollet B. & I. Arzul, (2008): Actine genes in *Bonamia ostreae* : characterization, application to phylogeny and to diagnostic.

Communication orale. 100th Annual Meeting National Shellfisheries Association, April 6-10, 2008, Providence, Rhode Island, USA

Morga B., Arzul I., Faury N., Garcia C., Lerond S., Robert M., Chollet C., Lapegue S., Renault T. (2010) Host responses to infection with *Bonamia ostreae* : comparison between resistant and wild flat oysters. Communication orale. Aquaculture 2010. 1-5 March 2010. San Diego, California, U.S.A.

Prado-Alvarez M., Chollet B., Faury N., Robert M., Morga B. , Ibara D. J., Lupo C., Renault T., Arzul I. (2012) Interactions between *Ostrea edulis* galectin (Oe-Gal) and the protozoan parasite *Bonamia ostreae*. Communication orale. 104th Annual Meeting National shellfisheries 2012 March 24-29. Association Seattle, Washington, U.S.A.

Prado-Alvarez M., Chollet B., Faury N., Robert M., Morga B. , Ibara D. J., Lupo C., Renault T., Arzul I. (2012) . Interactions between *Ostrea edulis* galectin (Oe-Gal) and the protozoan parasite *Bonamia ostreae*. Communication orale. 5th Meeting of the Microcell Working Group Central, 9-10 February 2012, Veterinary Institute, Lelystad, the Netherlands.

Renault T., Arzul I., Chollet B., François C., Joly J.-P., Miossec L. & M. Robert, (2006). Herpesviruses infecting molluscs: an overview. Communication orale. International Workshop on Summer Mortality of Marine Shellfish, 11-14 October 2006, Busan, Corée

Renault T., Arzul I., Chollet B., Faury N., François C., Garcia C., Haffner P., Joly J.-P., Miossec L., Omnes E., Pépin J.F., Robert M., Saulnier D., Segarra A. (2011) Increased mortality outbreaks of French Pacific oysters *Crassostrea gigas* since 2008 in Europe: detection of pathogens and emergency response. Communication orale. 1st Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health 5 - 8 July, 2011, Cairns Australia

Avis-expertise

Avis rédigés sur la période 2004-2013 :

Destinataires	Laboratoires d'analyses	Commission européenne	OIE	DPMA/D GAL
2004	7			
2005	8			
2006	6	1		1
2007	13	1	2	
2008	10			4
2009	9	2	1	4
2010	10	1		
2011	12			
2012	9			
2013	4			

Expertises :

2008 : participation au groupe de travail sur les espèces sensibles aux maladies aquatiques pour l'EFSA (European Food Safety Authority). Contribution à la rédaction du rapport final (http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902178477.htm).

2008 : participation au groupe de travail organisé par la DG Recherche (Commission Européenne) pour définir les priorités en termes de recherche sur les maladies des coquillages dans la perspective de proposer un appel d'offre pour un projet européen.

2009 – 2010 : participation au groupe de travail OIE sur la surveillance des maladies aquatiques : contribution à la rédaction d'un chapitre sur la surveillance de la bonamiose.

2010 : participation à l'évaluation AERES des équipes LEMA, Le Havre et GenECoM, Caen (23 et 24 Novembre 2010)

Revue d'articles et de projets

Révision d'articles 2006-2013 :

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Bulletin of EAAP	1	2				1		
Diseases of Aquatic Organisms		3	2	3	3		1	5
Journal of Invertebrate Pathology			1			1	1	
Marine Biology Records	1						1	
Marine Ecology Progress Series				1				
Applied And Environmental Microbiology					1			
Aquaculture					1	2		
Fish And Shellfish Immunology						1	2	1
Journal Of Fish Diseases						1		
Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom						1		
Journal Of Virology						1		
Virus Research						1		
Microbial Biology						1		
Aquaculture Research							1	1
Journal Of Molecular Epidemiology & Evolutionary Genetics Of Infectious Diseases								1
Total	2	5	3	4	5	10	6	8

Révision de projets :

2013 : révision de deux projets pour le Comité Français d'Évaluation de la Coopération Universitaire et Scientifique avec le Brésil

2013 : révision d'un projet de recherche pour l'Université de Macquarie, New South Wales, Australia

Participation à des jurys de thèse

2005. Jury de thèse (vétérinaire) d'Estelle Blanchet. «La Bonamiose de l'huître plate *Ostrea edulis*, bilan des connaissances actuelles, analyses des données collectées en France de 1989 à 2004, mesures de lutte et perspectives. Thèse Docteur Vétérinaire, 17 octobre 2005, Université Paul Sabatier, Toulouse.

2009. Jury de thèse de Maria Prado « Estudio de la repuesta immune de la almeja fina *Ruditapes decussatus*. » Universidade de Santiago de Compostella . Espagne. 12 juin 2009

2010-Jury de thèse de Mitja Gombac « Protozoan infestation dynamics and occurrence of neoplasias in digestive gland of mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Slovene sea in correlation with sea temperature, salinity and oxygenation » Veterinary Faculty University of Ljubljana, Slovénie, 9 juillet 2010

2010- Jury de thèse de Benjamin Morga. «Etude des interactions hôte/parasite chez l'huître plate *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae* » Thèse soutenue le 28 septembre 2010 à La Rochelle. Université La Rochelle

2012- Jury de thèse d'Estelle Harrang « Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la caractérisation de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose et pour la détection de signatures de la sélection naturelle. ». Thèse soutenue le 12 juillet 2012 à La Rochelle. Université de La Rochelle

2012- Jury de thèse de Séverine Boyer « Ecologie du Copépode Calanoïde *Paracartia grani*. Implication dans le cycle de vie du parasite *Marteilia refringens* dans la lagune de Thau » Thèse soutenue le 11 décembre 2012 à Montpellier. Université Montpellier 2

2013- Jury de thèse de Cindy Binias. « Epizootologie et contribution à la caractérisation de l'agent infectieux de la maladie du muscle marron, une pathologie émergente de la palourde japonaise (*Venerupis philippinarum*) »; Thèse soutenue le 6 décembre 2013 à Arcachon. Ecole Doctorale Sciences et Environnements Université Bordeaux 1.
