

**ÉTUDES PORTANT SUR LE TURBELLARIÉ *URASTOMA CYPRINAE* ET SON  
RAPPORT AVEC L'HUÎTRE *CRASSOSTREA VIRGINICA* ©**

**THÈSE PRÉSENTÉE À  
LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE MONCTON  
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES (M. Sc.)**

**PAR  
NICOLE T. BRUN, B. Sc.**

**DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
UNIVERSITÉ DE MONCTON**

**1999**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-47257-4

**Canada**

***Je dédie ma thèse***

***à mon père Ovide et à mes frères David et Curtis  
pour leur support et leurs mots d'encouragements***

***&***

***à ma mère Sandra  
(1944-1996)***

***Son amour, son courage et sa 'joie de vivre'  
sont mes sources d'inspiration.  
Je lui en serai toujours reconnaissante ♥.***

## **Remerciements**

J'aimerais premièrement remercier mon directeur de thèse, Andrew D. Boghen, pour ses nombreux conseils, sa disponibilité, le temps qu'il a consacré à lire mes écrits (maintes et maintes fois), pour sa patience 'd'ange' quand je ne réussissais pas toujours à suivre mes échéanciers, et enfin pour m'avoir permis d'obtenir une excellente formation dans les domaines de l'aquaculture et de la parasitologie. Je lui en suis reconnaissante.

Je remercie Neil W. Ross (Conseil national de recherches Canada, Institut des biosciences marines, Halifax, N.-É) pour sa collaboration avec les techniques biochimiques, pour son aide avec la rédaction de l'article portant sur ce sujet, et pour m'avoir fait réaliser que la biochimie est un domaine intéressant et passionnant.

Je remercie aussi Jacques Allard (Département de Mathématiques et Statistiques, Université de Moncton) pour son aide et ses nombreux conseils, et pour sa collaboration avec les analyses statistiques.

Merci à mon comité aviseur pour leur disponibilité et pour m'avoir guidé tout au long de ce projet, et je remercie aussi les membres de mon jury de thèse, qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Un gros merci à mon collègue et bon ami Érick Bataller pour tout son aide et pour nos discussions enrichissantes pendant les dernières années.

Je remercie Léo Blanchard (Département d'audio-visuel, Université de Moncton) pour sa patience, son efficacité et pour l'excellent travail qu'il a fait avec mes nombreux dessins, photos et diapositives.

Un gros merci à tous mes plus proches ami(e)s, à 'la gang de bio', et spécialement à Denise et Mike pour leur mots d'encouragement et leur soutien pendant les dernières années – dans les bons moments aussi bien que pendant les moments plus difficiles.

## **Membres du comité aviseur**

Andrew D. Boghen, Université de Moncton – Directeur

Stéphan Reebbs, Université de Moncton

Patrick Maltais, Université de Moncton

Jacques Allard, Université de Moncton

Sharon McGladdery, Ministère des Pêches et Océans, Centre des Pêches du Golfe,  
Moncton

## **Membres du jury**

Stéphan Reebbs, Université de Moncton – Président

Andrew D. Boghen, Université de Moncton

Sharon McGladdery, Ministère des Pêches et Océans, Centre des Pêches du Golfe,  
Moncton

Marcel Le Pennec, Université de Bretagne Occidentale – Évaluateur externe

## RÉSUMÉ

Le turbellarié *Urastoma cyprinae* est retrouvé sur les branchies de plusieurs espèces de mollusques bivalves. Au Canada atlantique, ce 'ver des branchies' est le plus souvent observé chez l'huître *Crassostrea virginica*. Des études récentes ont démontré que *U. cyprinae* est capable d'induire une réaction pathologique au niveau des branchies de son hôte. Ces constatations laissent entendre que le ver est plus qu'un simple commensal, contrairement à ce qui a été suggéré par certains auteurs. Afin de mieux comprendre la nature de la relation et les dynamiques d'interactions entre *U. cyprinae* et l'huître, des études comportementales, quantitatives et biochimiques ont été entreprises.

Pour déterminer le degré d'attraction de *U. cyprinae* envers l'huître, une expérience sur le terrain, ainsi qu'une série d'expériences au laboratoire ont été menées. Les résultats démontrent que *U. cyprinae* est très attiré envers les huîtres, indiquant que sa présence dans cet hôte reflète plus qu'un hasard. D'autant plus, le ver est attiré spécifiquement au mucus sécrété par les branchies de l'huître. Ces résultats s'accordent avec l'idée avancée par Fleming (1986), qui suggère que le mucus joue un rôle dans l'alimentation du ver.

Une étude quantitative a été effectuée afin d'examiner la distribution de *U. cyprinae* sur les branchies de l'huître en tenant compte des caractéristiques physiques du mucus sur des régions branchiales spécifiques, soient les zones dorsales, médianes et ventrales. Les résultats montrent que, bien que *U. cyprinae* est distribué sur toute la surface branchiale, les vers sont le plus souvent retrouvés le long du sillon dorsal, c'est-à-dire dans les zones dorsales des branchies. Plusieurs hypothèses sont avancées afin d'expliquer ces résultats. Le mucus du sillon dorsal est moins visqueux que celui de la

zone ventrale. Il en résulte donc que le mucus du sillon dorsal est plus accessible pour les activités du ver. De plus, si le tégument joue un rôle dans le transfert des nutriments entre le corps du ver et le milieu extérieur, tel que suggéré par certains auteurs, les régions dorsales permettraient un contact plus intime entre le corps de *U. cyprinae* et le flux du mucus. D'ailleurs, si *U. cyprinae* ne se nourrit pas uniquement du mucus mais aussi des particules capturées dans cette substance, la préférence de *U. cyprinae* pour les zones dorsales, où les particules présentes sont de qualité nutritive importante serait compréhensible.

Finalement, des études biochimiques ont été menées afin d'examiner s'il y a des changements dans l'activité protéolytique du mucus branchial de l'huître en réponse à la présence de *U. cyprinae*. Une expérience comparant l'activité enzymatique du mucus provenant d'huîtres infectées et non infectées par *U. cyprinae* démontre qu'il y a une inhibition de l'activité protéolytique dans les échantillons de mucus provenant d'huîtres infectées. Une deuxième expérience comparant les profils enzymatiques du mucus incubé avec des vers 'nourris' et des vers 'à jeun' indique qu'il y a des changements importants dans l'activité protéolytique du mucus incubé avec les vers 'à jeun'. Ces observations suggèrent que l'activité enzymatique du mucus branchial est affecté par *U. cyprinae*. Bien que les sources et les rôles précis de ces protéases n'ont pas été définis à partir de nos études, les résultats confirment qu'il y a des changements biochimiques qui pourraient peut-être être reliés à des activités de digestion de la part de *U. cyprinae*.

**Mots clés :** Turbellaria, *Urostoma cyprinae*, mollusques, huître, *Crassostrea virginica*, branchies, mucus, électrophorèse, protéases, activité protéolytique

## ABSTRACT

The turbellarian *Urastoma cyprinae* is reported on the gills of several species of bivalve molluscs. In Atlantic Canada, the 'gill-worm' is most frequently associated with the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Recent investigations have demonstrated that *U. cyprinae* can induce pathological reactions to host gill tissue. These observations dispel the likelihood that *U. cyprinae* is an innocent commensal, as has previously been suggested. To better understand the nature of the relationship and the dynamics of the interactions between *U. cyprinae* and the eastern oyster, behavioral, quantitative and biochemical studies were undertaken.

In order to determine the attraction of *U. cyprinae* to oysters, a series of field and laboratory experiments were conducted. Results show that *U. cyprinae* displays a definite attraction to oysters, indicating that its presence on the gills is more than coincidental. Moreover, *U. cyprinae* is highly attracted to the mucus that is secreted by the oyster gills. These observations reinforce the suggestion made by Fleming (1986), that mucus plays an important role in the feeding activities of *U. cyprinae*.

Secondly, a quantitative experiment was undertaken in order to examine the distribution of *U. cyprinae* on the gills of oysters in relation to certain physical characteristics of mucus found in the dorsal, medial and ventral regions of the gills. Results show that *U. cyprinae* are most frequently found along the basal food tract (dorsal regions). The following hypotheses can be proposed to explain these findings. The mucus contained in the basal food tract takes the form of a low-viscous mucus slurry, compared to the much higher viscosity characterizing the mucus cord found in the ventral



region. The mucus in the dorsal regions may, therefore, prove to be more attractive to *U. cyprinae*, because of accessibility and ease of ingestion. Furthermore, if the tegument that surrounds the worm plays a role in the transfer of nutrients across the body wall, as has been suggested by certain authors, then the dorsal regions would provide more intimate contact between the body of *U. cyprinae* and the mucus slurry in this area. If *U. cyprinae* does not feed exclusively on gill mucus, but also on the particles embedded in this substance, then the worm's preference for dorsal regions, where highly nutritive material is present, can be expected.

Finally, comparative studies on the effects of *U. cyprinae* on the electrophoretic profiles of oyster gill mucus was examined using proteases as markers. *In vivo* experiments on mucus proteases from oysters infected and non-infected by *U. cyprinae* show that strong protease activity was detected in the non-infected mucus samples, while very little or no activity was observed in the infected mucus samples. Another experiment comparing the protease banding patterns of mucus incubated with 'fed' *U. cyprinae* and 'starved' *U. cyprinae* revealed that major changes in protease activity was detected in the mucus sample exposed to 'starved' worms. These observations suggest that the enzymatic activity of oyster mucus is affected by the presence of *U. cyprinae*. While the sources and the precise roles of these proteases remain speculative, the latter may turn out to be a consequence of digestion-related activities induced by *U. cyprinae*.

**Key words :** Turbellaria, *Urastoma cyprinae*, molluscs, eastern oyster, *Crassostrea virginica*, gills, mucus, electrophoresis, proteases

## Avant-propos

Cette thèse a été rédigée sous forme d'articles scientifiques. Certains aspects du format de ce document varient donc par rapport à une thèse traditionnelle. Ils sont mentionnés ci-dessous.

1. Les articles scientifiques de cette thèse ont été rédigés en anglais avec un résumé en français au début de chacun. Toute autre section (i.e introduction générale, discussion générale, etc.) a été rédigée en français;
2. Dans les sections **INTRODUCTION GÉNÉRALE**, **DISCUSSION GÉNÉRALE** et **ANNEXE**, le format de présentation de la littérature citée est celui du *Diseases of Aquatic Organisms*;
3. Le **CHAPITRE 1** intitulé 'Attraction d'*Urastoma cyprinae* Graff, 1882 (Turbellaria : Urastomidae) envers l'huître *Crassostrea virginica*' a été rédigé selon le format de présentation de *Diseases of Aquatic Organisms*. Ce travail a été accepté pour publication dans le journal ci-haut et est présentement sous presse;
4. Le **CHAPITRE 2** intitulé 'Distribution du turbellarié *Urastoma cyprinae* sur les branchies de l'huître *Crassostrea virginica*' a été rédigé selon le format de présentation du *Journal of Shellfisheries Research* et sera publié en juin 1999 dans le Volume 18(1) de cette revue;
5. Le **CHAPITRE 3** intitulé 'Variations des profils électrophorétiques des protéases du mucus branchial de l'huître *Crassostrea virginica* en réponse à l'infestation par le turbellarié *Urastoma cyprinae*' a été rédigé selon le format de présentation du *Journal of Invertebrate Pathology* et sera soumis pour publication au début juillet 1999;
6. L'ordre rigoureux de présentation des figures et des tableaux dans les articles n'est pas suivi, étant donné que ceux-ci font partie d'articles indépendants rédigés selon des formats spécifiques.

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	iii
Avant-propos .....	v
Liste des Figures.....	viii
Liste des Tableaux.....	x

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. L'huître <i>Crassostrea virginica</i> .....	1
1.1 Importance économique.....	1
1.2 Biologie de l'huître .....	2
1.3 Maladie et parasites de l'huître .....	6
2. Le turbellarié <i>Urastoma cyprinae</i> .....	8
2.1 Historique et distribution géographique.....	8
2.2 Aspects biologiques .....	11
2.3 Effets d' <i>U. cyprinae</i> sur les mollusques.....	12
3. Mise en perspective du projet .....	13
4. Références.....	16

### CHAPITRE 1 – ATTRACTION D'*URASTOMA CYPRINAE* GRAFF, 1882 VERS L'HUÎTRE *CRASSOSTREA*

1. Résumé en français .....	19
2. Article scientifique.....	21

### CHAPITRE 2 – DISTRIBUTION DU TURBELLARIÉ *URASTOMA CYPRINAE* SUR LES BRANCHIES DE L'HUÎTRE *CRASSOSTREA VIRGINICA*

1. Résumé en français .....	44
2. Article scientifique.....	46

### CHAPITRE 3 – VARIATIONS DES PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DES PROTÉASES DU MUCUS BRANCHIAL DE L'HUÎTRE *CRASSOSTREA VIRGINICA* EN RÉPONSE À L'INFESTATION PAR LE TURBELLARIÉ *URASTOMA CYPRINAE*

1. Résumé en français .....	69
2. Article scientifique.....	71

<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>101</b>
1. Références.....	107

## **ANNEXE**

1. Observations endoscopiques.....	110
2. Références.....	112

## Liste des Figures

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

Figure 1.	Anatomie interne de l'huître <i>Crassostrea virginica</i> .....	3
Figure 2.	Schéma des quatre demibranches de l'huître démontrant les lamelles ascendantes et descendantes. ....	4
Figure 3.	<i>Urastoma cyprinae</i> . ....	9

### CHAPITRE 1

Figure 1.	Whole mount of <i>Urastoma cyprinae</i> . ....	37
Figure 2.	Scanning electromicrograph of <i>Urastoma cyprinae</i> on the oyster gill filaments. ....	37
Figure 3.	Specially-designed glass chambers used in experiments with <i>Urastoma cyprinae</i> . ....	38
Figure 4.	Number of <i>Urastoma cyprinae</i> counted in each well containing the respective stimulants tested. ....	39
Figure 5.	Number of <i>Urastoma cyprinae</i> present in each well containing the following materials tested during each of the 6 trials (experiment 7): isolated oyster mucus, gills, gills free of mucus and sea water. ....	40

### CHAPITRE 2

Figure 1.	Schematic diagram of the oyster, after removal of the right valve, displaying the dorsal and ventral axes, left mantle, and raised right mantle exposing the gills. ....	63
Figure 2.	Schematic diagram of the four gill demibranchs of an oyster displaying the ascending and descending lamellae. Enlargement of area in rectangle to show details of one of the two lamellae forming an oyster demibranch. ....	64

- Figure 3. Box and whiskers plot representing the number of worms observed in oysters for each of the counting zones (ventral, medial, dorsal) of the ascending and descending lamellae for each of the four demibranchs. .... 65

### CHAPITRE 3

- Figure 1a. Protease activity of mucus samples collected from six non-infected and six infected oysters as detected with zymography. .... 98
- Figure 1b. Protein analysis of mucus samples taken from non-infected and infected oysters using SDS-PAGE followed by staining with amido black..... 98
- Figure 2a. Protease activity of mucus samples (rehydrated lyophilized mucus) exposed to starved or fed *U. cyprinae* using zymography..... 99
- Figure 2b. Protein patterns of mucus samples (rehydrated lyophilized mucus) exposed to starved *U. cyprinae* or fed *U. cyprinae* using SDS-PAGE followed by silver staining..... 99
- Figure 3. Protease activity of whole starved *U. cyprinae* and whole fed *U. cyprinae* as detected by zymography. .... 100
- Figure 4. Effect of proteinase inhibitors on the activity of fresh oyster mucus as detected on gelatin-containing SDS-PAGE gels (zymograms). .... 100

### ANNEXE

- Figure 1. Observations directes d'*Urastoma cyprinae* sur les filaments branchiaux de l'huître en utilisant des techniques de vidéo-endoscopie. .... 114

## Liste des Tableaux

### CHAPITRE 1

- Tableau 1. Prevalence, mean and range of intensity of *Urastoma cyprinae* in *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis* and *Mya arenaria* in Shippagan Bay during the summer of 1997..... 41
- Tableau 2. Results of the Student *t* tests for equality between the number of worms attracted to each stimulant of a tested pair. .... 42
- Tableau 3. P-value for the Tukey multiple comparisons test based on the data using the four-well glass chambers (experiment 7)..... 43

### CHAPITRE 2

- Tableau 1. Results of the log-linear model analysis. .... 66
- Tableau 2. Multiplicative effects for each of the three factors and their interactions..... 67
- Tableau 3. Observed and expected mean number of worms for each of the three zones (ventral, medial, dorsal), and the differences in percentages between them for the ascending and descending lamellae for each of the four demibranchs.... 68

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1. L'huître *Crassostrea virginica*

#### 1.1 Importance commerciale

L'ostréiculture se pratique sur les côtes pacifiques et atlantiques du pays. Parmi les espèces cultivées, on compte *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* en Colombie Britannique, *Ostrea edulis* au sud-est de la Nouvelle-Écosse, et surtout *Crassostrea virginica* au Canada atlantique.

La culture de *Crassostrea virginica* se fait depuis 1810 (Stafford 1913) en Amérique du Nord. Elle a commencé au New Jersey, États-Unis, où des huîtres ont été transplantées des bancs publiques à des sites d'élevages privés. Au Canada atlantique, *Crassostrea virginica* est cultivée surtout au Sud-est du Golfe du St-Laurent au Nouveau-Brunswick, en Nouvelle-Écosse et à l'Île-du-Prince-Édouard. Trois types d'élevage sont pratiqués au Canada atlantique, soit l'élevage sur le fond, en surélévation et en suspension. Le choix de la technique de culture varie selon les conditions environnementales du site et les propriétés physico-chimiques de l'eau.

L'industrie ostréicole est un domaine très prometteur et démontre un potentiel économique important pour le Canada. En 1997, la production totale était de 265 tonnes (567 000\$) au Nouveau-Brunswick, 288 tonnes (1 030 000\$) en Nouvelle-Écosse et 1432 tonnes (3 181 000\$) à l'Île-du-Prince-Édouard. La production totale pour le Canada atlantique était de 1 985 tonnes, ce qui équivaut à environ 4,8 millions de dollars.



## 1.2 Biologie de l'huître

L'huître *Crassostrea virginica* (Fig. 1) est un bivalve pseudolamellibranche de la famille Ostreidae. Il possède un corps mou qui est protégé par deux valves rigides constituées de carbonate de calcium enrobée dans une matrice protéinique (conchiolin) et attachées ensemble par un ligament. Les valves de l'animal sont asymétriques: la valve gauche, celle qui est toujours en contact avec le sédiment, est plus grosse et massive que celle de droite.

Le corps de l'huître est entouré d'une couche de tissu appelé le manteau, constitué d'un lobe gauche et d'un lobe droit. Le manteau de l'huître, comparé à celui d'autres espèces comme le pétoncle *Placopecten magellanicus*, la moule *Mytilus edulis* ou la mye commune *Mya arenaria* (Ward *et al.* 1991), n'est pas fusionné aux valves (Eble and Scro 1996). L'espace entre les deux lobes du manteau s'appelle la cavité palléale et renferme, entre autres, les branchies qui représentent le plus gros organe chez cet animal.

Les deux branchies de l'huître sont de type hétérorhabdite, c'est-à-dire qu'elles comportent des filaments ordinaires et principaux. Elles sont formées de quatre demibranches, et chacune d'elle est constituée d'une lamelle ascendante et descendante (Fig. 2). Le degré d'association entre les filaments d'une même lamelle varie chez les différentes espèces de mollusques. Chez l'huître, un pseudolamellibranche, on reconnaît des jonctions interfilamentaires ciliaires et tissulaires.

Parmi d'autres fonctions, les branchies assurent la respiration du bivalve en échangeant des gaz provenant du milieu extérieur. L'huître consomme en moyenne entre 3,0 à 5,3 mg d'oxygène par heure (Galstoff 1964). Le taux de consommation d'oxygène par l'huître est influencé par des facteurs externes et internes. Parmi les

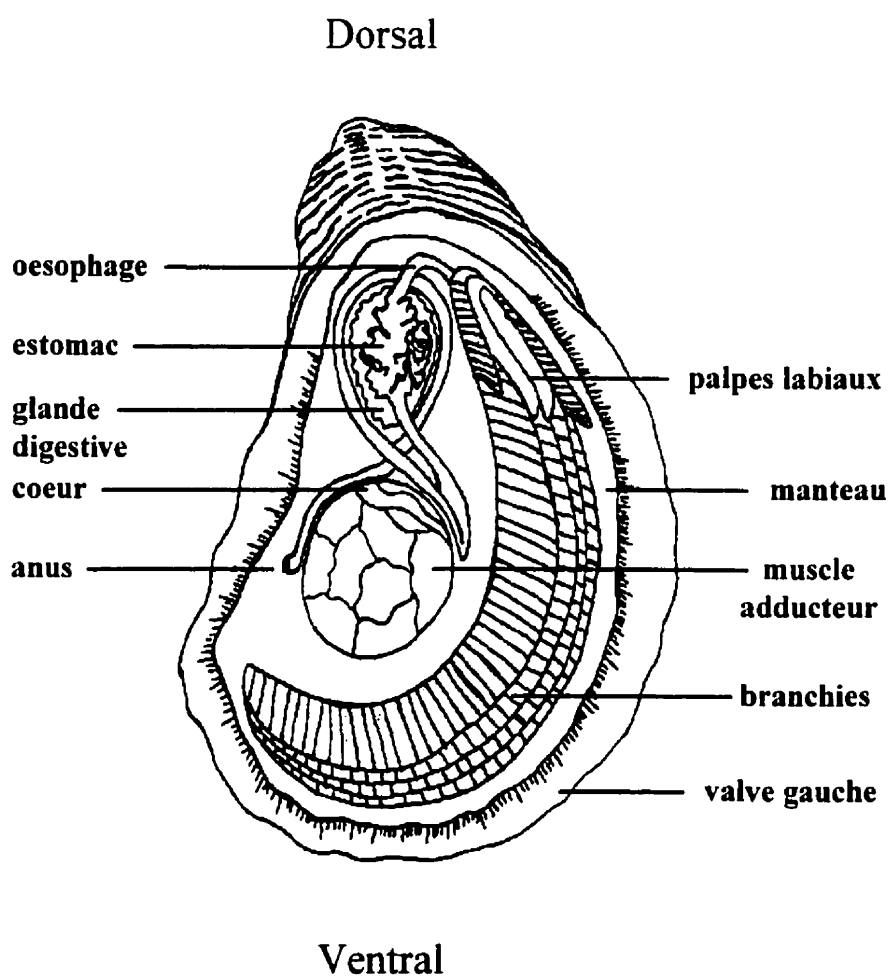


Figure 1. Anatomie interne de l'huître *Crassostrea virginica*  
(valve droite enlevée).

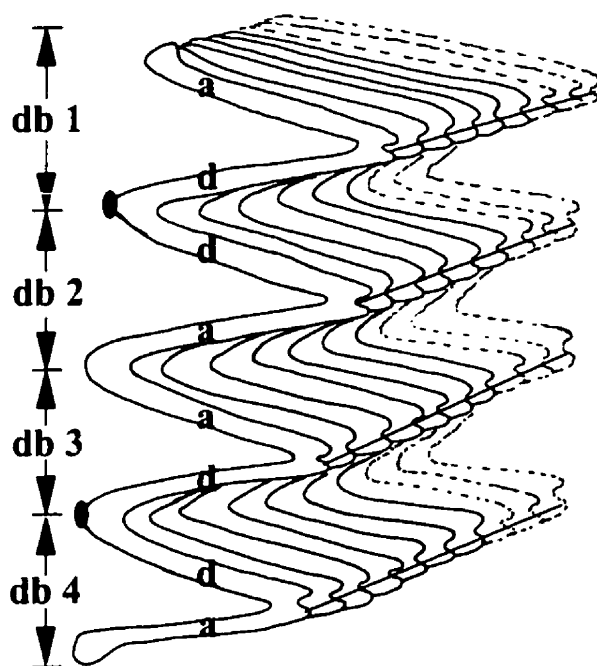


Figure 2. Schéma des quatre demibranches de l'huître démontrant les lamelles ascendantes et descendantes.

facteurs externes on retrouve la température et la salinité de l'eau, de même que l'abondance des algues unicellulaires et autres particules dans la colonne d'eau. Lavoie (1995) a suggéré que les facteurs internes qui peuvent influencer le montant d'oxygène consommé sont le taux de glycogène et la quantité d'eau contenus dans les tissus, l'état de santé des gonades et l'état de santé globale de l'animal.

Les branchies jouent un rôle primordial dans l'alimentation de l'animal. Les cils retrouvés sur les branchies créent des courants qui provoquent l'entrée et la sortie de l'eau par les valves. Les branchies filtrent et capturent les particules présentes dans la colonne d'eau. Par la suite, les branchies effectuent un triage entre les particules non-nutritives, qui sont rejetées sous forme de pseudofèces, et nutritives, qui sont enrobées de mucus et transportées à la bouche pour être ingérées (Ward *et al.* 1997). Bien que plusieurs facteurs puissent influencer la filtration, ce sont surtout la salinité et la température qui affectent le plus cette dernière. La salinité permettant une filtration optimale se situe entre 14 ppt et 28 ppt. La température optimale à laquelle l'huître filtre l'eau à sa capacité maximale est entre 15 °C à 18 °C (Medcof 1961). Toutefois, lorsque la température de l'eau descend sous 5 °C, l'huître ferme ses valves et arrête de filtrer. Une huître adulte est capable de filtrer jusqu'à 34 l d'eau par heure (Loosanoff and Nomejko 1946).

Chez *Crassostrea virginica*, les sexes sont séparés mais il y a aussi des hermaphrodites (Thompson *et al.* 1996). Le développement des gonades est affecté par de nombreux facteurs externes incluant la température, la salinité, l'alimentation et la présence de divers polluants (Loosanoff and Engle 1942). Les animaux atteignent la maturité sexuelle au cours de la deuxième année. Une femelle peut produire jusqu'à 70

millions d'oeufs par année, et le mâle produit également un taux élevé de spermatozoïdes. Dans les Maritimes, la ponte s'effectue normalement en juin et juillet, lorsque la température de l'eau augmente au delà de 20 °C. Cette activité se manifeste pendant une période d'environ six semaines. La fécondation est externe et la simultanéité du relargage des gamètes mâles et femelles est importante, mais c'est de leur qualité et des facteurs de l'environnement (température, hydrodynamisme) que dépendra l'intensité du recrutement. Le développement des larves s'effectuent quelques heures après la fécondation et les juvéniles passent par de nombreux stades larvaires avant d'atteindre le stade adulte.

### 1.3 Maladies et parasites de l'huître

Plusieurs groupes d'organismes sont la cause de problèmes et de maladies chez *Crassostrea virginica*. Malgré le fait que certains de ces organismes n'induisent peu ou pas de réactions de la part de l'hôte, d'autres sont responsables d'effets très néfastes, et dans certains cas, le résultat final est la destruction totale de populations entières d'huîtres. Un parasite se définit comme étant un organisme qui vit sur ou dans un autre organisme au dépend d'un hôte. Un commensal, par contre, est un organisme qui bénéficie de la présence d'un hôte, en ne l'affectant ni de façon positive ni négative, et qui ne nécessite pas la présence de cet hôte durant tout son cycle de vie.

Parmi les différentes maladies qui affectent les huîtres, les plus importantes sont causées par des protozoaires qui affectent des populations d'huîtres aux États-Unis (Burrell 1985). Les parasites *Perkinsus marinus*, *Haplosporidium nelsoni* et *H. costale* sont retrouvés dans des populations d'huîtres sur la côte est, du Maine jusqu'à la Floride

et le long du Golfe du Mexique (Ford and Tripp 1996). Ces microorganismes sont responsables pour les maladies Dermo, MSX et SSO, et sont la cause de mortalités importantes chez les huîtres de ces régions. Jusqu'à présent, les huîtres sur la côte est du Canada n'ont pas été affectées par ces deux maladies destructrices.

Au Canada atlantique, la maladie de Malpègue est apparue en 1915 à l'Île-du-Prince-Édouard après un transfert d'huîtres provenant de la Nouvelle-Angleterre. Cette maladie a provoqué une mortalité d'environ 98% de la population (McGladdery *et al.* 1993). En 1954, la maladie s'est répandue au Nouveau-Brunswick et en Nouvelle-Écosse avec des effets similaires. Des mesures de précautions ont été prises en 1993, dans le but de minimiser le transfert d'huîtres afin d'éviter une autre apparition de la maladie. Présentement, les populations d'huîtres au Canada atlantique semblent être résistantes aux maladies. L'agent responsable de cette maladie n'a toujours pas été identifié et fait toujours l'objet de présentes études.

La maladie du pied ou maladie de la charnière est causée par une moisissure, *Ostracoblabe implexa*, qui se développe lorsque la température de l'eau s'élève à plus de 20°C. Cet organisme pénètre l'intérieur de la coquille jusqu'à la surface de l'animal et cause des déformations sur la surface interne de la coquille (petits points blancs surélevés). Si la région affectée se retrouve près du muscle adducteur, cela cause des problèmes pour la fermeture des valves. Si les infections deviennent sévères, l'huître est affaiblie et meurt. D'autres organismes qui affectent la coquille de l'huître sont les éponges, *Cliona celata*, qui, lorsque présentes en très grand nombre, causent des dommages sérieux aux coquilles (Lavoie 1995). Les polychètes, *Polydora sp.*, sont rarement pathogènes mais affectent plutôt l'apparence externe de l'huître. Du point de

vue esthétique, cela cause des problèmes chez les consommateurs, ce qui résulte en une diminution de la valeur commerciale de l'huître (Lavoie 1995).

Certains autres organismes sont retrouvés dans les huîtres mais ne sont pas pathogènes. Ceux-ci sont des ciliées présents sur les branchies (de type *Sphenophrya*) ou dans l'intestin de l'huître (de type *Ancystrococoma*), des virus présents dans les gamètes (de type *Papillomavirus*) et des bactéries retrouvées dans les tissus épithéliaux du système digestif (McGladdery and Stephenson 1991, McGladdery *et al.* 1993).

En ce qui concerne les macroorganismes, selon les résultats d'un programme de monitoring pour les huîtres de la côte est du Nouveau-Brunswick (Plourde *et al.* 1991, Boghen *et al.* 1993) et ceux d'autres études parallèles (McGladdery *et al.* 1992, McGladdery *et al.* 1993), l'organisme qui a été le plus souvent observé chez l'huître est *Urastoma cyprinae*, un turbellarié retrouvé sur les branchies.

## **2. Le turbellarié *Urastoma cyprinae***

### **2.1 Historique et distribution géographique**

*Urastoma cyprinae* (Fig. 3) est un turbellarié qui mesure en moyenne entre 0,4 mm et 0,8 mm de longueur. Il possède un corps entouré d'un tégument qui est formé d'un épithélium cilié mince (Noury-Sraïri *et al.* 1990). *U. cyprinae* ne possède pas de capsule cervicale, mais plutôt un cerveau diffus (Cannon 1986). Il contient un pore oral-génital qui s'ouvre dans la partie postérieure de son corps, et il est caractérisé par deux yeux pigmentés angulaires, situés dans la région antérieure (Burt and Bance 1981, Pike and Wink 1986, Tyler and Burt 1988). *U. cyprinae* démontre un phototropisme négatif

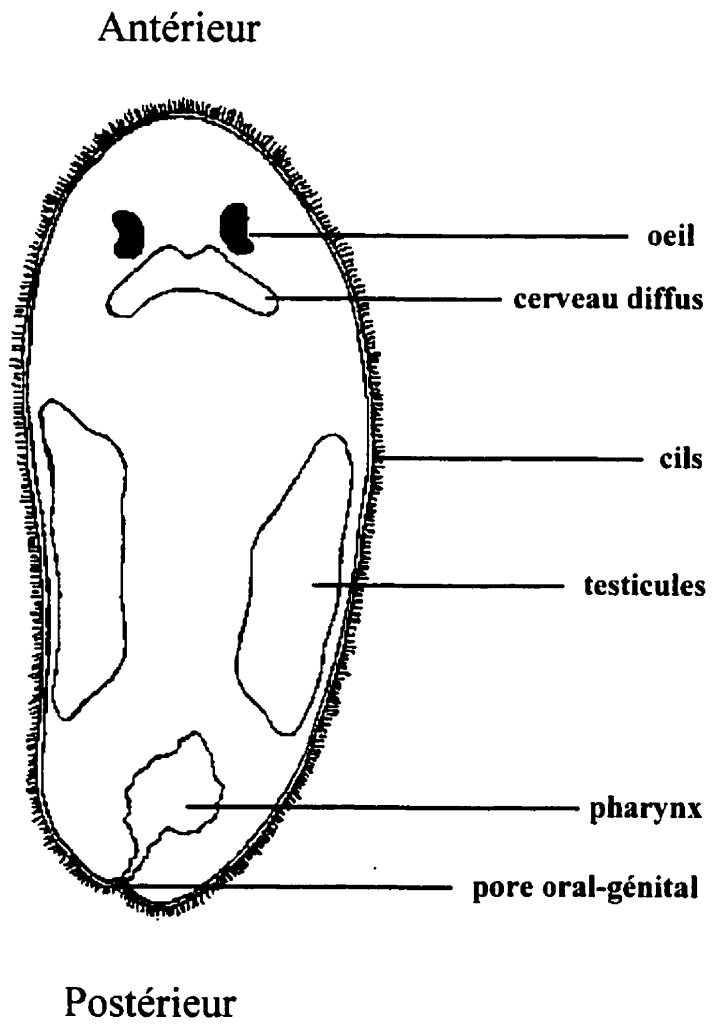


Figure 3. *Urastoma cyprinae*.



lorsqu'il est exposé à la lumière (Burt and Bance 1981, Pike and Wike 1986, Cannon and Lester 1988).

*Urastoma cyprinae* a premièrement été décrit par Graff en 1882 comme étant *Acmostoma cyprinae*. Dörler (1900) l'a ensuite identifié comme étant *Urastoma fausseki*. En 1903, Graff a associé l'espèce *cyprinae* au genre *Urastoma* puisqu'il considérait que celle décrite par Dörler (1900), *U. fausseki*, était synonyme de *U. cyprinae*. Graff (1903) a décrit une nouvelle famille *Genostomidae* qui contenait deux genres: *Urastoma* (Dörler) et *Genostoma* (Dörler). Resinger (1924, 1926) a transféré l'espèce de Graff *cyprinae* du genre *Urastoma* au genre *Cylindrostoma* et a souligné que le ver décrit par Sabussow (1900) *Enterostoma mytili* était synonyme de *cyprinae*. Marcus (1951) a étudié la classification des *Cylindrostomatidae* (Resinger) et des *Urastomatidae*, et a transféré l'espèce *cyprinae* du genre *Cylindrostoma* au genre *Urastoma*. Marcus a expliqué que les genres *Cylindrostoma* et *Urastoma* étaient très différents selon la classification proposée par Karling (1940). Marcus (1951) a décrit une nouvelle espèce *Urastoma evelinae*, qui, selon lui, était différent de *U. cyprinae*. Selon Westblad (1955) ces différences étaient insignifiantes et indique que *U. evelinae* et *U. cyprinae* sont synonymes.

*Urastoma cyprinae* a été observé sous forme libre, parmi les algues marines et dans la boue sur le littoral au Brésil (Marcus 1951), et le long de la côte adriatique en Yougoslavie (Westblad 1955). Ce ver plat a aussi été retrouvé sur les palpes labiaux et les branchies de plusieurs espèces de mollusques bivalves à travers le monde, soit chez *Cyprinae islandica*, *Mytilus galloprovincialis*, *M. edulis*, *Modiola modiolus*, *Solen vagina*, *Tridacna gigas* et *T. maxima* (Dörler 1900, Westblad 1955, Goggin et Cannon

1989, Noury-Sraïri *et al.* 1990, Murina et Solonchenko 1991, Robledo *et al.* 1994, Teia dos Santos et Coimbra 1995, Trotti *et al.* 1998). Au Canada atlantique, *U. cyprinae* a été identifié chez la moule, *Mytilus edulis*, et l'huître, *Crassostrea virginica* (Burt et Drinnan 1968, Fleming *et al.* 1981, Fleming 1986, Plourde *et al.* 1991, McGladdery *et al.* 1992, Boghen *et al.* 1993).

## 2.2 Aspects biologiques

Le taux d'incidence d'*U. cyprinae* chez les huîtres est maximal pendant les mois chauds de l'été, et faible ou nul pendant les mois d'hiver (Fleming *et al.* 1981, Fleming 1986). Plourde *et al.* (1991) et McGladdery *et al.* (1992) ont remarqué que le niveau d'infestation par *U. cyprinae* pouvait être très élevé, parfois en nombre plus que 1 000 par huître.

Il a été observé que les vers juvéniles retrouvés entre juin et janvier ne possèdent pas d'organes reproducteurs mâles ou femelles (Fleming *et al.* 1981, Fleming 1986). Des vers adultes échantillonnés entre septembre et janvier contiennent des testicules mais aucun oeuf en développement, tandis que ceux observés entre mai et juin possèdent du vitellaria, des oeufs bien développés et une abondance de sperme dans le pénis (Fleming *et al.* 1981, Fleming 1986). Fleming *et al.* (1981) suggèrent que les juvéniles se développent sur ou dans les mollusques, puisqu'aucun oeuf encapsulé n'a été retrouvé dans les femelles.

Chez l'huître, aucun lien n'a été décelé entre le nombre de vers et la grosseur des bivalves, malgré le fait que des huîtres de grande taille possèdent une plus grande surface branchiale (McGladdery *et al.* 1992). Cependant, chez la moule, *Mytilus*

*galloprovincialis*, une corrélation positive entre le nombre d'*U. cyprinae* et la taille des bivalves a été observée (Murina et Solonchenko 1991).

Certains auteurs ont remarqué que le nombre d'*U. cyprinae* dans les huîtres et les moules est plus élevé chez des bivalves cultivés sur le fond que chez ceux cultivés en suspension (Plourde *et al.* 1991, McGladdery *et al.* 1992). De plus, Murina et Solonchenko (1991) ont trouvé que des moules provenant de substrats vaseux présentaient une infestation supérieure par *U. cyprinae* qu'aux bivalves fixés sur des substrats rocheux. Ces travaux suggèrent qu'il existe possiblement une relation entre le niveau d'infestation par les vers et la nature du substrat, et que ceci a lieu lorsque les bivalves sont en contact avec le sédiment. (McGladdery *et al.* 1992). Il se peut aussi que le sédiment ainsi que la végétation aquatique servent d'habitats ou de niches pour *U. cyprinae* lorsque le turbellarié se retrouve sous forme libre.

### 2.3 Effets d'*U. cyprinae* sur les mollusques

La compréhension de la relation hôte-parasite qui existe entre *U. cyprinae* et les bivalves est un aspect qui n'est pas pleinement résolu. Certains auteurs suggèrent que le turbellarié n'est qu'un commensal, puisqu'il peut exister sous forme libre sans la présence d'un hôte (Burt et Drinnan 1968). D'après Goggin et Cannon (1989), *U. cyprinae* ne démontre pas d'effet pathogène chez les espèces de coques géantes *Tridacna gigas* et *T. maxima*. D'autres se réfèrent à *U. cyprinae* comme étant un commensal facultatif, qui, à part de légères irritations, est bénigne pour l'hôte (Jennings 1971, Kinne 1983). McGladdery (1990) indique que, bien qu'une présence élevée de vers (jusqu'à 1000 par huître) ne paraît pas influencer la santé de son hôte sous des conditions

environnementales favorables, sous des conditions stressantes, un nombre élevé d'*U. cyprinae* pourrait affaiblir les huîtres.

D'autres chercheurs indiquent qu'*U. cyprinae* peut peut-être provoquer des réactions négatives sur l'état de santé de son hôte. Les travaux préliminaires de Plourde *et al.* (1991) démontrent que la quantité de glycogène et l'indice physiologique (poids sec de la chair par rapport au poids sec des valves) des huîtres sont inversement corrélés au degré d'infestation par *U. cyprinae*. Murina et Solonchenko (1991) ont suggéré que, sous certaines conditions, *U. cyprinae* peut influencer la reproduction, la composition biochimique et même le taux de croissance des moules, *M. galloprovincialis*. De plus, Robledo *et al.* (1994) ont clairement démontré qu'il existe une pathologie provoquée par *U. cyprinae* au niveau des branchies de la moule, *M. galloprovincialis*, et que celle-ci peut avoir des effets sévères. Entre autres, on observe une hypertrophie des filaments branchiaux et une infiltration importante d'hémocytes. Ces auteurs considèrent *U. cyprinae* comme une menace pour l'industrie mytilicole en Espagne.

### **3. Mise en perspective du projet**

Malgré les travaux décrits ci-dessus, nos connaissances sur certains aspects de la biologie de base d'*Urostoma cyprinae* restent très limitées. Plus spécifiquement, notre compréhension de la relation entre *U. cyprinae* et son hôte demeure limitée à des observations incomplètes et à plusieurs constatations sans preuve. Il est donc important de pouvoir établir de façon plus rigoureuse les types d'interactions entre *U. cyprinae* et son hôte, c'est-à-dire, de déterminer la nature des activités (raisons d'être) du turbellarié

dans son hôte, et d'identifier jusqu'à quel point ceux-ci influencent les activités de l'huître.

Il a été démontré qu'*U. cyprinae* provoque une pathologie évidente chez les moules en Espagne, telle que décrite par Robledo *et al.* (1994). Cette constatation implique que la présence d'*U. cyprinae* dans son hôte est plus qu'un simple hasard, et mérite une attention particulière. Puisque, dans notre région, *U. cyprinae* est retrouvé en grand nombre sur les branchies de l'huître, *Crassostrea virginica* (Plourde *et al.* 1991, McGladdery *et al.* 1992), on ne peut donc pas exclure la possibilité qu'une situation semblable à celle décrite pour les moules en Espagne puisse se produire chez les populations d'huîtres des provinces atlantiques. Étant donné le potentiel économique de l'ostréiculture dans le Canada atlantique, il est nécessaire de connaître les effets possibles d'*U. cyprinae* chez les huîtres, et d'acquérir une bonne appréciation des types d'interactions entre ces deux organismes, afin d'anticiper et de prévenir d'éventuelles perturbations à l'industrie ostréicole de notre région.

En bref, ce projet est un recueil de trois expériences dont les objectifs principaux sont les suivants:

- 1) de déterminer s'il existe une attraction d'*U. cyprinae* par les huîtres, comment cette attraction pour l'huître se compare avec celles pour d'autres espèces de mollusques, et vérifier si le mucus joue un rôle dans l'attraction d'*U. cyprinae* envers l'huître.
- 2) d'examiner la distribution d'*U. cyprinae* sur les branchies de l'huître en relation avec certaines caractéristiques du mucus retrouvée dans des régions branchiales spécifiques.

- 3) de déterminer s'il existe des changements dans l'activité enzymatique (protéases) du mucus d'huître dû à la présence de *U. cyprinae*.

#### 4. Références

Boghen AD, Allard J and Bataller E (1993) Rapport final et recommandations sur le programme de monitoring pour la côte est du Nouveau-Brunswick, Centre de recherche en sciences de l'environnement. Université de Moncton, Moncton, Nouveau-Brunswick, 76 pp.

Burrell VG (1985) Oyster Culture, pp. 235-273 in Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States. JV Huner and EE Brown (eds.) Wesport, Conn.: AVI Publishing Co.

Burt MDB and Bance GN (1981) Ultrastructure of the eye of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria, Allocoeoela). *Hydrobiologia* 84:276

Burt MDB and Drinnan RE (1968) A microturbellarian found in oysters off the coast of Prince Edward Island. *J Fish Res Bd Can* 25(11):2521-2522

Cannon LRG (1986) Turbellaria of the world - A guide to families and genera. Queensland. Brisbane, Australia, 132 pp

Cannon LRG and Lester RJG (1988) Two turbellarians parasitic in fish. *Dis Aquat Org* 5:15-22

Dörler A (1900) Neue und wenig bekannte rhabdocöle Turbellarien. *Z Wiss Zool* 68:1-41

Eble AF and Scro R (1996) General anatomy, pp. 19-73 in The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Kennedy VS, Newell RIE & Eble AF (eds.) Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland

Fleming LC Burt MDB and Bacon GB (1981) On some commensal Turbellaria of the Canadian East Coast. *Hydrobiologia* 84:131-137

Fleming LC (1986) Occurrence of symbiotic turbellarians in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Hydrobiologia* 132:311-315

Ford, SE and Tripp MR (1996) Diseases and Defense Mechanisms pp. 581-660 in The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Kennedy VS, Newell RIE & Eble AF (eds.) Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland

Galstoff PS (1964) The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish Bull* 64:1-480

Goggin CL and Cannon LRG (1989) Occurrence of a turbellarian from Australian tridacnid clams. *Int J Parasitol* 19(3):345-346

- Jennings JB (1971) Parasitism and commensalism in the Turbellaria. *Adv Parasitol* 9:1-29
- Kinne O (1983) Oyster diseases of marine animals. Wwstholsteinische Verlagsdruckerei, Boyens & Co., Germany, 1038 pp
- Lavoie RE (1995) Culture of the American Oyster *Crassostrea virginica* pp. 189-224 in *Cold-Water Aquaculture in Atlantic Canada*, Second Edition, Boghen AD (ed.) Université de Moncton, Moncton, New Brunswick, Canada
- Loosanoff VL and Engle JB (1942) Accumulation and discharge of spawn by oysters living at different depths. *Biol Bull.* 42(3):413-422
- Loosanoff VL and Nomejko CA (1946) Feeding of oysters in relation to tidal stages and to periods of light and darkness. *Biol Bull* 90(3):244-264
- Marcus E (1951) Turbellaria Brasileros (9) Boletins da faculdade filosofia ciencias e letras, Universidade Sao Paolo. *Zoologia* 16:5-215
- McGladdery SE (1990) Shellfish diseases on the east coast of Canada. *Bull Aquacul Assoc Canada* 8:14-18
- McGladdery SE and Stephenson MF (1991) Parasites and diseases of suspension- and bottom-grown shellfish from Eastern Canada. *Bull Aquacul Assoc Canada* 91-3:64-65
- McGladdery SE, Boghen AD and Allard J (1992) *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) in Eastern Oyster *Crassostrea virginica* - Population dynamics and effects. *Bull Aquacul Assoc Canada.* 92-3:17-19
- McGladdery SE, Drinnan RE and Stephenson MF (1993) A manual of parasites, pests and diseases of Canadian Atlantic bivalves. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci* 1931, 121 pp
- Medcof JC (1961) Oyster farming in the Maritimes. *Bull Fish Res Bd Can* 131
- Murina GV and Solonchenko AI (1991) Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea : *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) and *Polydora ciliata* (Polychaeta). *Hydrobiologia* 227:385-387
- Noury-Sraïri N, Justine JL and Euzet L (1990) Ultrastructure du tégument et des glandes sous épithéliales de *Urastoma cyprinae* («Prolecithophora»), turbellarié parasite de Mollusque. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie*, 13<sup>e</sup> Série 11:53-71



- Pike AW and Wink R (1986) Aspects of photoreceptor structure and phototactic behavior in Platyhelminthes, with particular reference to the symbiotic turbellarian, *Paravortex*. *Hydrobiologia* 132:101-104
- Plourde SM, Boghen AD and Allard J (1991) Incidence of the Turbellarian, *Urastoma cyprinae*, in Oyster, *Crassostrea virginica*. *Bull Aquacul Assoc Canada* 91-3:72-73
- Robledo JAF, Cáceres-Martínez J, Sluys R and Figueras A (1994) The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes : Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain : occurrence and pathology. *Dis Aquat Org* 18:203-210
- Stafford J (1913) *The Canadian Oyster*. Ottawa: Commission of Conservation, Mortimer Co.
- Teias dos Santos AM and Coimbra J (1995) Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L., in Ria de Aveiro : gonad symbiotic infestation. *Aquaculture* 132:195-211
- Thompson RJ, Newell, RIE, Kennedy VS and Mann R (1996) Reproduction Processes and Early Development pp. 335-370 in *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Kennedy VS, Newell RIE & Eble AF (eds.) Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland
- Trotti GC, Baccarani EM, Giannetto S, Giuffrida A and Paesanti F (1998) Prevalence of *Myticola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Dis Aquat Org* 32:145-149
- Tyler S and Burt MDB (1988) Lensing by a mitochondrial derivate in the eye of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria, Prolecithophora). *Fortsch Zool* 36: 229-234
- Ward JE, Beninger PG, MacDonald BA and Thompson RJ (1991) Direct observations of feeding structures and mechanisms in bivalve molluscs using endoscopic examination and video image analysis. *Mar Biol* 111:287-291
- Ward JE, Levinton JS, Shumway SE and Cucci T (1997) Site of particle selection in a bivalve mollusc. *Nature* 390:131-132
- Ward JE, Levinton JS, Shumway SE and Cucci T (1998) Particle sorting in bivalves: in vivo determination of the pallial organs of selection. *Marine Biology* 131:283-292
- Westblad E (1955) Marine "Alloeoceols" (Turbellaria) from North Atlantic and Mediterranean coast. *Arkiv för Zoologi* 7(24):491-526

# CHAPITRE 1 - ATTRACTION D'*URASTOMA CYPRINAE* GRAFF, 1882 (TURBELLARIA : URASTOMIDAE) ENVERS L'HUÎTRE *CRASSOSTREA VIRGINICA*

## 1. Résumé en français

*Urastoma cyprinae* est un turbellarié retrouvé sur les branchies de certaines espèces de mollusques bivalves. Ainsi, au Canada atlantique, le “ver des branchies” est associé principalement avec l’huître *Crassostrea virginica*.

Quoique certains auteurs ont considéré *U. cyprinae* comme étant un commensal, des études ultérieures ont démontré que le turbellarié peut causer du tort à son hôte. Robledo *et al.* (1994) ont clairement démontré l’induction d’une réaction pathologique de la part d’*U. cyprinae* au niveau des branchies de la moule *Mytilus galloprovincialis*, résultant en une hypertrophie des filaments branchiaux et une infiltration importante d’hémocytes dans les régions entourant les vers. Sachant l’importance économique de l’industrie ostréicole de l’est du Canada, on ne peut pas exclure la possibilité qu’une situation semblable puisse se produire dans notre région.

Afin de mieux comprendre les dynamiques d’interactions entre *U. cyprinae* et l’huître, une expérience sur le terrain ainsi qu’une série d’expériences au laboratoire sur les réponses chimiotactiques d’*U. cyprinae* envers divers stimuli ont été menées. Les objectifs étaient les suivants: 1) de déterminer si *U. cyprinae* est attiré envers les huîtres, 2) comparer cette attraction du ver pour l’huître avec celles pour d’autres mollusques de notre région et 3) de déterminer si le mucus de l’huître joue un rôle dans l’attraction d’*U. cyprinae* envers son hôte.

Les résultats des expériences sur le terrain et au laboratoire indiquent qu’*U. cyprinae* est très attiré envers les huîtres. Ceci confirme que la présence d’*U. cyprinae* chez l’huître

représente plus qu'un simple hasard. D'autant plus, *U. cyprinae* a démontré une plus forte attraction envers les huîtres qu'envers les moules et les coques.

Nos résultats montrent que le turbellarié est attiré de façon significative par le mucus de l'huître, et à moins forte intensité, aux branchies d'huîtres isolées. Ceci pourrait être attendu, puisque les branchies sont recouvertes de mucus, une substance qui joue un rôle primordial dans le traitement des particules chez les bivalves suspensivores (Ward et al. 1994, Ward 1996). Ces résultats s'accordent avec Fleming (1986), qui suggère qu'*U. cyprinae* se nourrit du mucus sécrété par les branchies d'huîtres.

2. Article scientifique

**ATTRACTION OF *URASTOMA CYPRINAE* GRAFF, 1882 (TURBELLARIA :  
URASTOMIDAE) TO THE EASTERN OYSTER *CRASSOSTREA VIRGINICA***

Nicole T. Brun<sup>1\*</sup>, Andrew D. Boghen<sup>1</sup> and Jacques Allard<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biology, Université de Moncton, Moncton, NB, E1A 3E9, Canada*

<sup>2</sup>*Department of Mathematics and Statistics, Université de Moncton, NB, E1A 3E9,  
Canada*

---

\*E-mail: enb3887@umoncton.ca

## ABSTRACT

*Urastoma cyprinae* has been reported on the gills of various bivalve species, including the eastern oyster *Crassostrea virginica*. While earlier workers refer to *U. cyprinae* as a commensal, recent findings reveal that the "gill-worm" can be pathogenic to its molluscan host and may, therefore, also be considered to be parasitic. To determine whether there exists a definite attraction of *U. cyprinae* to oysters, a series of experiments were conducted using specially-designed glass chambers. Results indicate that *U. cyprinae* is negatively phototactic, and that it is more attracted to oysters when compared to other molluscan species such as mussels and clams. *U. cyprinae* was found to be highly attracted to isolated oyster mucus, and, to a lesser extent, to mucus-coated gill tissue. Findings confirm that the presence of *U. cyprinae* in oysters is not coincidental, and that mucus plays an important role in attracting the worms to its host.

Key words : Turbellaria, *Urastoma cyprinae*, molluscs, *Crassostrea virginica*, gills, oyster mucus

## INTRODUCTION

*Urastoma cyprinae* is a ciliated turbellarian that measures between 0.4 to 0.8 mm in length. It has two prominent eye spots situated anteriorly (Burt and Bance 1981, Pike and Wink 1986, Tyler and Burt 1988) and an oral-genital pore located at the posterior end (Fig. 1).

*Urastoma cyprinae* has been reported as free-living in marine mud and on algae (Marcus 1951, Westblad 1955). It has also been described on the gills of various bivalve species, including the clams *Tridacna maxima* and *T. gigas* (Goggin and Cannon 1989), and the mussels *M. edulis* (Fleming et al. 1981, Teia dos Santos and Coimbra 1995) and *M. galloprovincialis* (Noury-Sraïri et al. 1990, Murina and Solonchenko 1991, Robledo et al. 1994, Trotti et al. 1998). In Atlantic Canada, this worm (Fig. 2) has been observed in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Burt and Drinnan 1968, Fleming et al. 1981, Fleming 1986, Boghen et al. 1993).

The nature of the host-parasite relationship has never been well-defined. Although Burt and Drinnan (1968) and Fleming et al. (1981) consider *Urastoma cyprinae* to be a commensal in oysters, and therefore, not harmful to its host, a more recent study (Robledo et al. 1994) has shown that the worm is responsible for serious destruction of host gill tissue in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

Fleming (1986) suggested that, in oysters, *Urastoma cyprinae* feeds on the mucus coating the gills. This, however, has never been the subject of any

scientific investigation. If it can be shown that the worms are attracted to mucus, such a finding would support this contention.

The current study attempts to determine 1) if there is a definite attraction of *Urastoma cyprinae* to oysters, 2) how this compares to other molluscan species and 3) to establish whether mucus plays a role in attracting the worm to its host.

## MATERIALS AND METHODS

### *Field Study*

In June 1997, 300 adult oysters (*Crassostrea virginica*), 300 mussels (*Mytilus edulis*), and 300 clams (*Mya arenaria*) were obtained from the following commercial culture operations in Atlantic Canada: Cocagne Oyster Farm, Chiasson Aquaculture and Mills Sea Food Ltd. Ten bivalves of each species were dissected and carefully examined under a dissecting microscope, to make certain that they were free of *U. cyprinae*. The molluscs were combined and subsequently separated into three heterogeneous groups, each group consisting of 100 animals of each of the three species. These were placed into standard Vexar bags (0.6 m x 1.2 m, 1 cm mesh) and anchored on the ocean bottom along a beach in Shippagan Bay (New Brunswick, Canada), in an area where *Urastoma cyprinae* is known to occur. The bags were held at a depth of 25 cm (below low tide), and separated from each other by distances of 4 meters. Sampling was conducted every 3 to 4 weeks over 5 months, at which time 10 molluscs of each species were collected from each bag for a composite sample size of  $n = 90$ . The animals were transported in plastic bags on ice to the Université de Moncton and were examined for *U. cyprinae* under a dissecting microscope within 48 hours of arrival. A total of 150 molluscs of each of the three species were collected and examined (Table 1).



### *Laboratory Study*

Seven experiments were conducted between the spring of 1995 and the fall of 1997, using wild oysters infected with *Urastoma cyprinae* collected at low tide in Shippagan Bay, New Brunswick. The oysters were transported in plastic bags to the Université de Moncton at either 4°C for experiments 1 and 2 or at ambient water temperatures of 20°C to 23°C for experiments 3 to 7. The oysters were opened and the worms were removed from the gills using a Pasteur pipette. They were divided into groups of 60 to 100 depending on the experiment (see below), and maintained in glass Petri dishes in filtered sea water (25 ‰) for 12 hours. All experiments were conducted at room temperature (22-23°C) and in total darkness (based on our findings from experiment 1) in specifically-designed glass chambers with either two or four interconnected wells (Fig. 3). The total volume capacity of the two- and four-well glass chambers was 3.4 ml and 7.0 ml respectively.

To determine the response of *Urastoma cyprinae* to light vs dark conditions, in experiment 1, half of the wells of the experimental glass chambers were covered with dark plastic, thus preventing light penetration on one side. Sea water (25 ‰), filtered twice (Whatman Qualitative filter paper, < 11µm) was added to the chambers through the central opening (Fig. 3a) to provide an aqueous medium in which the worms could move freely. A total of 10 trials using 60 worms/trial was undertaken. *U. cyprinae* were introduced into the chambers through the central opening and after 60 minutes the wells were drained with a

pipette and the worms were counted under a dissecting microscope.

Experiments 2 to 4 explored the extent of attraction of *Urastoma cyprinae* to whole oysters versus sea water (5 trials, 60 worms/trial), whole oysters versus whole mussels (10 trials, 60 worms/trial) and whole oysters versus whole clams (10 trials, 60 worms/trial). The possible attractants were mixed with an equal amount of filtered sea water (25 ‰) and homogenized for 2 minutes, after which the homogenates were diluted with filtered sea water at 1:10 (v/v) homogenate : sea water. The mixtures were subsequently centrifuged for 5 minutes at 3800 RPM, and the semi-formed pellets were collected by pipette and introduced into the wells of the glass chambers. This was immediately followed by the addition of sea water and *U. cyprinae*, as previously described for experiment 1.

Experiments 5 and 6 were conducted using the two-well chambers to test the attraction of *Urastoma cyprinae* to the following potential attractants : isolated oyster mucus versus oyster body (without gills) and isolated oyster mucus versus gills. These studies were based on 10 trials (60 worms/trial). Experiment 7 made use of the four-well chambers (Fig. 3b) and explored the attraction of *U. cyprinae* to the following stimulants: isolated oyster mucus versus gills versus mucus-free gills versus sea water. Processing of all stimulants was similar to that described above, with the exception of isolated oyster mucus and mucus-free gills.

For the preparation of isolated oyster mucus, three millileters of mucus was carefully drawn by pipette from the oyster gills, diluted with 10 parts filtered sea

water (25 ‰) and concentrated at 3800 RPM for 5 minutes. Preparation of mucus-free gills involved gentle rinsing of isolated gills with filtered sea water five to six times, followed by homogenization of gill tissue and centrifugation as described above.

Student *t* tests were employed to analyze the data based on the findings using the two-well glass chambers. A one-way ANOVA, followed by the Tukey multiple comparisons test was used to analyze the data based on the experiment employing the four-well glass chambers (Zar 1984).

## RESULTS

The field study demonstrates that *Urastoma cyprinae* is more attracted to oysters than to the other molluscan species (Table 1). *U. cyprinae* is consistently more prevalent in oysters (100%), compared to mussels (0 to 16.6%) and clams (3.3 to 33.3%). This tendency is also reflected by the average mean number of worms per oyster (45.3 to 346.9) compared to individual mussels (0 to 0.03) and clams (0.07 to 0.6) respectively.

The results of the *t* tests based on the data using the two-well glass chambers are summarized in Table 2. Experiment 1 (Fig. 4a) demonstrates that *Urastoma cyprinae* is negatively phototactic ( $p < 0.001$ ). Results of experiments 2 through 4 (Figs. 4b to 4d) show that *U. cyprinae* is more attracted to oysters compared to sea water ( $p = 0.028$ ), and this phenomenon is also evident when the worms are offered a choice between oysters and mussels ( $p < 0.001$ ), and oysters and clams ( $p = 0.020$ ).

Data from experiments 5 and 6 indicate that *Urastoma cyprinae* is more attracted towards isolated oyster mucus ( $p = 0.004$ ) than to the oyster body (without gills), but there is no significant difference in attraction ( $p = 0.174$ ) when *U. cyprinae* has to choose between isolated oyster mucus and isolated gill tissue (Figs. 4e and 4f).

In experiment 7 (Table 3), the Tukey test confirms that *U. cyprinae* is most attracted to isolated oyster mucus, followed by gills, mucus-free gills and sea

water respectively (Fig. 5). Examination of the normal probability plots for each attractant show the residuals are approximately normal. The standard deviation varies from approximately 3 to 9 among the 4 possible attractants. As a consequence a non-parametric test was also carried out to confirm the ANOVA results.

## DISCUSSION

Although *Urastoma cyprinae* occurs as a free-living organism (Marcus 1951, Westblad 1955), it has also been observed on the gills of various bivalve molluscs (Burt and Drinnan 1968, Fleming et al. 1981, Fleming 1986, Goggin and Cannon 1989, Noury-Sraïri et al. 1990, Murina and Solonchenko 1991, Robledo et al. 1994, Teia dos Santos and Coimbra 1995). Burt and Drinnan (1968) described the association between *U. cyprinae* and the eastern oyster as being commensal. More recently, certain authors (Murina and Solonchenko 1991, Teia dos Santos and Coimbra 1995) have suggested that *U. cyprinae* induces pathology in mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*. Robledo et al. (1994) have shown conclusively that in the case of *M. galloprovincialis*, *U. cyprinae* causes serious disruption of gill filaments and significant hemocytic infiltration in the affected areas. These authors signal that *U. cyprinae* may be a potential threat to the mussel industry in Northern Spain.

Given the economic importance of the oyster industry in Eastern Canada, valued at 2.6 million dollars in 1995, a closer examination of the nature of the host-parasite relationship between *Urastoma cyprinae* and *Crassostrea virginica* is warranted.

Our work confirms that *Urastoma cyprinae* is highly attracted to oysters and that their presence in the host is not coincidental. Furthermore, the field work and laboratory experiments 2 to 4 indicate that *U. cyprinae* shows a greater

attraction to oysters than to other native molluscan species.

Fleming (1986) suggests that the turbellarian may be feeding on the mucus secreted by oyster gills. While the present research did not focus on the worm's diet, our results clearly indicate a definite attraction of *Urastoma cyprinae* to isolated oyster mucus. The attraction of *U. cyprinae* to both isolated oyster mucus and oyster gills is perhaps to be expected, given the fact that gills are heavily coated in mucus, and that the latter plays an integral part in the suspension-feeding of bivalve molluscs (Ward et al. 1994, Ward 1996).

*In-vivo* studies on suspension-feeding in bivalves using endoscopic techniques (Ward 1996) reveal that mucus present in the dorsal tracts is of low-viscosity and that particles are transported suspended in a mucus-slurry. This is qualitatively different from the high-viscosity mucus present along the ventral margins, in which material is bound in a continuous mucus string (Beninger et al. 1993). It would be an interesting challenge to establish if there is a correlation between the number of *Urastoma cyprinae* on specific regions of the oyster gills and mucus composition and flow. Such information may prove to be useful in future studies that focus on the incidence of *U. cyprinae* in relation to the rate of growth of oysters as well as the final quality of the cultured product.

## REFERENCES

Beninger PG, St-Jean S, Poussart Y and Ward E (1993) Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. *Mar Ecol Prog Ser* 98:275-282

Boghen AD, Allard J et Bataller E (1993) Rapport final et recommandations sur le programme de monitoring pour la côte est du Nouveau-Brunswick, Centre de recherche en sciences de l'environnement. Université de Moncton, Moncton, Nouveau-Brunswick, 76pp

Burt MDB and Bance GN (1981) Ultrastructure of the eye of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria, Allocoeoela). *Hydrobiologia* 84:276

Burt MDB and Drinnan RE (1968) A microturbellarian found in oysters off the coast of Prince Edward Island. *J Fish Res Bd Can* 25(11):2521-2522

Fleming LC Burt MDB and Bacon GB (1981) On some commensal Turbellaria of the Canadian East Coast. *Hydrobiologia* 84:131-137

Fleming LC (1986) Occurrence of symbiotic turbellarians in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Hydrobiologia* 132:311-315

Goggin CL and Cannon LRG (1989) Occurrence of a turbellarian from Australian tridacnid clams. *Int J Parasitol* 19(3):345-346

Marcus E (1951) Turbellaria Brasileros (9) Boletins da faculdade filosofia ciencias e letras, Universidade Sao Paulo. *Zoologia* 16:5-215

Murina GV et Solonchenko AI (1991) Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea : *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) and *Polydora ciliata* (Polychaeta). *Hydrobiologia* 227:385-387

Noury-Sraïri N, Justine JL et Euzet L (1990) Ultrastructure du tégument et des glandes sous épithéliales de *Urastoma cyprinae* («Prolecithophora»), turbellarié parasite de Mollusque. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie*, 13<sup>e</sup> Série 11:53-71

Pike AW and Wink R (1986) Aspects of photoreceptor structure and phototactic behavior in Platyhelminthes, with particular reference to the symbiotic



turbellarian, *Paravortex*. *Hydrobiologia* 132:101-104

Robledo JAF, Cáceres-Martínez J, Sluys R et Figueras A (1994) The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes : Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain : occurrence and pathology. *Dis Aquat Org* 18:203-210

Teias dos Santos AM and Coimbra J (1995) Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L., in Ria de Aveiro : gonad symbiotic infestation. *Aquaculture* 132:195-211

Trotti GC, Bacarani EM, Giannetto S, Giuffrida A and Paesanti F (1998) Prevalence of *Myticola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Dis Aquat Org* 32:145-149

Tyler S and Burt MDB (1988) Lensing by a mitochondrial derivate in the eye of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria, Prolecithophora). *Fortsch Zool* 36: 229-234

Ward E (1996) Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing, and fate. *J Invert Biol* 115(3):218-231

Ward E, Newell RIE, Thompson RJ and MacDonald BA (1994) *In Vivo* Studies of Suspension-Feeding Processes in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol Bull* 186:221-240

Westblad E (1955) Marine "Alloeoceols" (Turbellaria) from North Atlantic and Mediterranean coast. *Arkiv för Zoologi* 7(24):491-526

Zar JH (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, 718pp

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. H. Rosenthal (University of Kiel, Germany), Dr. M. D. B. Burt (Huntsman Marine Science Centre, St. Andrews, NB, Canada) and Dr. G. Miron (Department of Biology, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada), for reviewing our manuscript and for their very helpful comments and suggestions. We also thank Mr. John Dalgleish (Department of Physics, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada) and Professor Charles Maillet (School of Engineering, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada) for their technical assistance with the construction and the drawings of the experimental chambers used in the present study. Financial support provided to the senior author by the Faculty of Research and Graduate Studies of the Université de Moncton is appreciated. This project is part of the Richibucto Environment and Resource Enhancement Program.

Figure 1. Whole mount of *Urastoma cyprinae*. (arrows) eyes, (op) oral-genital pore

Figure 2. Scanning electromicrograph of *Urastoma cyprinae* on the oyster gill filaments. (u) *U. cyprinae*, (gf) gill filaments

Figure 3. Specially-designed glass chambers used in experiments with *Urastoma cyprinae*. (a) Two-well glass chamber; (b) Four-well glass chamber. (co) central opening, (w) well

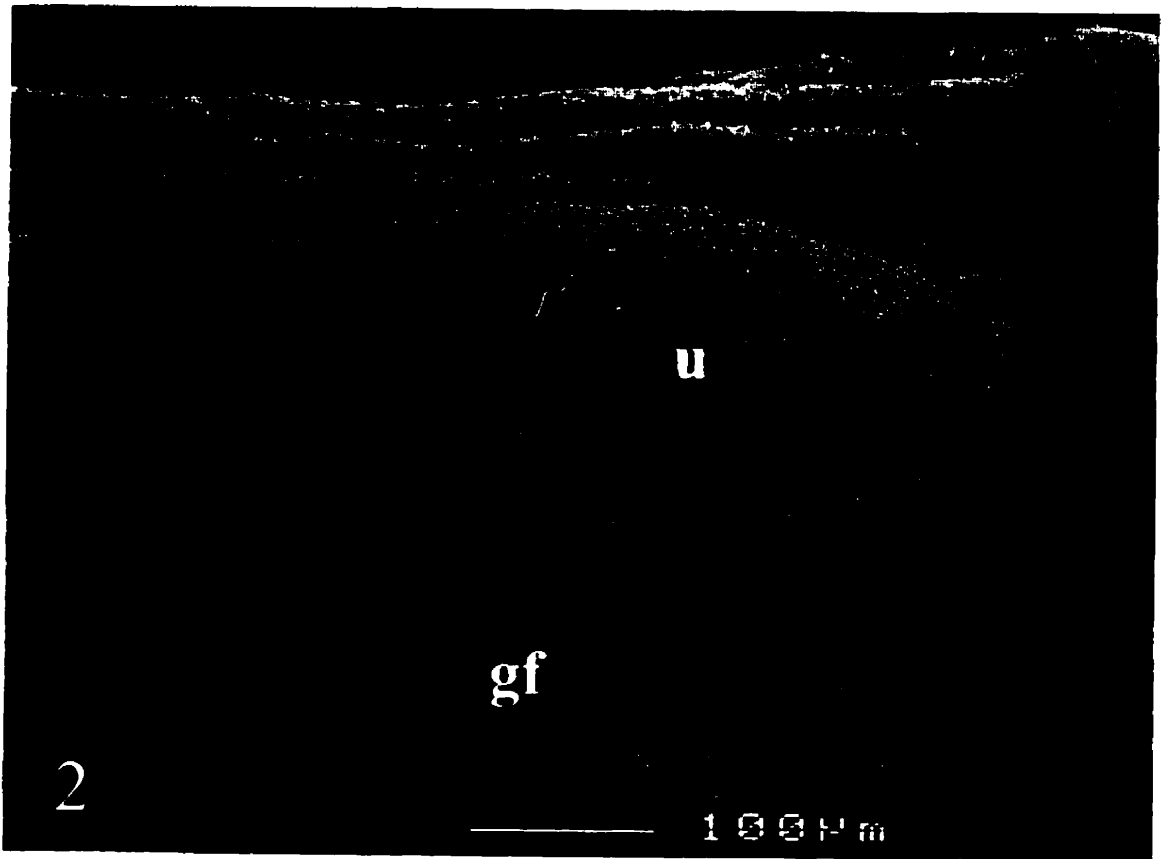
Figure 4. Number of *Urastoma cyprinae* recovered in each well containing the respective materials tested. Each bar represents one trial of the total number of *U. cyprinae* recorded. (a) Number of *U. cyprinae* depicted in wells under light and dark conditions (experiment 1); (b) Number of worms attracted to oyster versus sea water (experiment 2); (c) Number of *U. cyprinae* attracted to oysters versus mussels (experiment 3); (d) Number of worms attracted to oysters versus clams (experiment 4); (e) Number of *U. cyprinae* attracted to isolated oyster mucus versus oyster body with gills removed (experiment 5); (f) Number of worms attracted to isolated oyster mucus versus gills (experiment 6). The vertical lines indicate the average number of *U. cyprinae* for all trials for each stimulant tested

Figure 5. Number of *Urastoma cyprinae* (points) present in each well containing the following materials tested during each of the 6 trials (experiment 7): isolated oyster mucus, gills, gills free of mucus and sea water. The bars represent the mean number of worms for each of the four substances



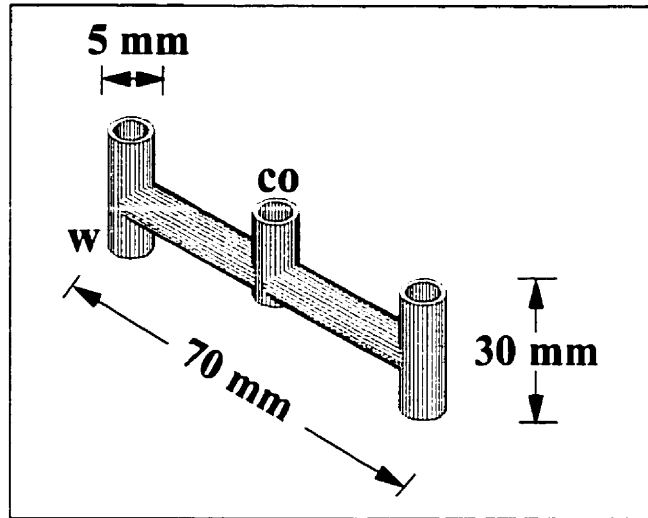
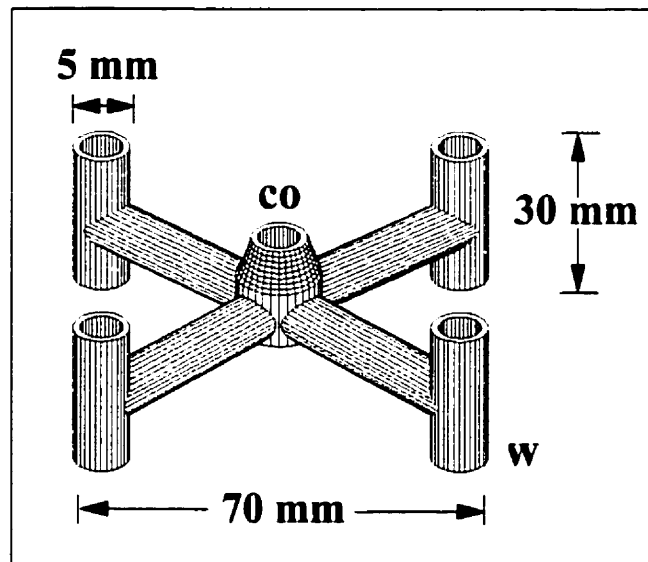
1

50μm



2

100μm

**a****b**



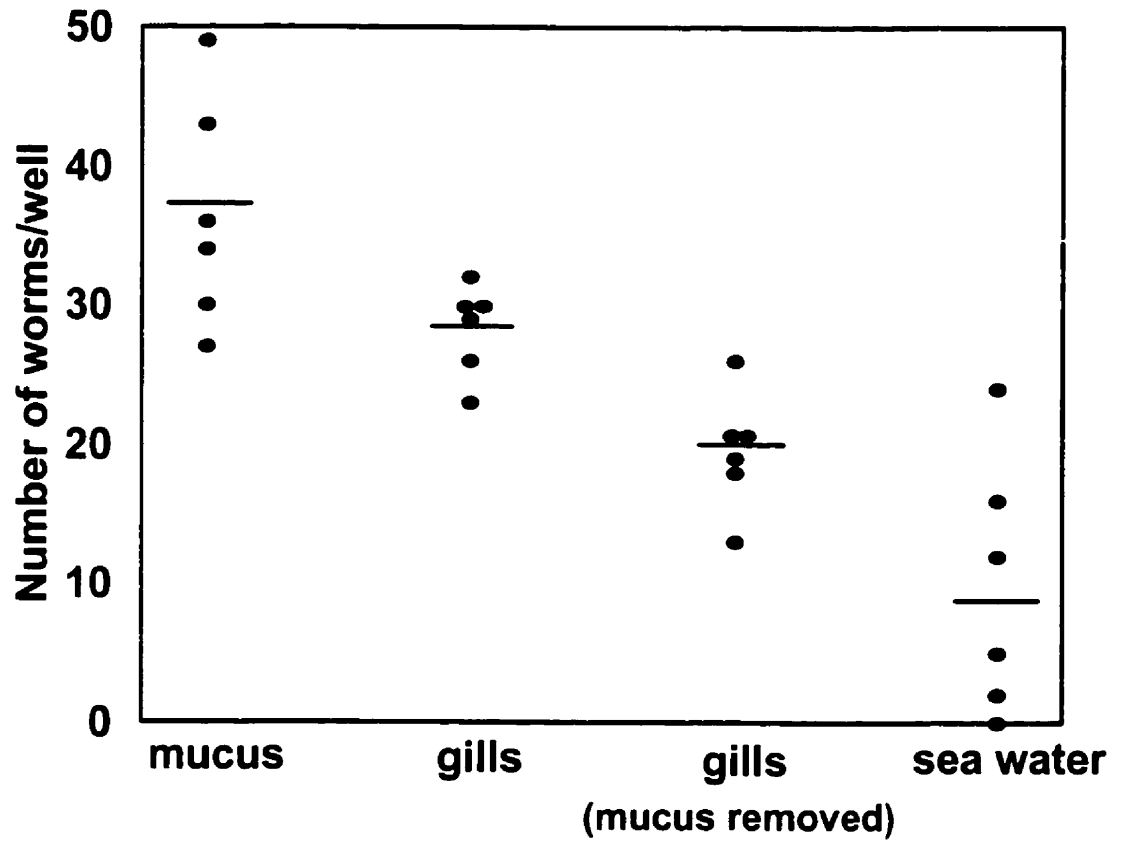


Table 1. Prevalence, Mean and Range of Intensity of *Urastoma cyprinae* in *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis* and *Mya arenaria* in Shippagan Bay during the summer of 1997.

Date Collected	Host	n	Prevalence (%)	Intensity	
				Mean <sup>1</sup>	Range
June 24	<i>C. virginica</i>	30	100	45.3	1 - 150
	<i>M. edulis</i>	30	0	0	0
	<i>M. arenaria</i>	30	3.3	0.1	3 - 3
July 21	<i>C. virginica</i>	30	100	309.5	49 - 656
	<i>M. edulis</i>	30	13.3	0.3	1 - 4
	<i>M. arenaria</i>	30	16.6	0.2	1 - 2
August 20	<i>C. virginica</i>	30	100	346.9	42 - 944
	<i>M. edulis</i>	30	16.6	0.1	1 - 2
	<i>M. arenaria</i>	30	33.3	0.6	1 - 5
September 19	<i>C. virginica</i>	30	100	97.6	23 - 251
	<i>M. edulis</i>	30	0	0	0
	<i>M. arenaria</i>	30	10	0.1	1 - 1
October 7	<i>C. virginica</i>	30	100	313	18 - 833
	<i>M. edulis</i>	30	0	0	0
	<i>M. arenaria</i>	30	6.6	0.07	1 - 1

<sup>1</sup> average number of parasites per infected host



Table 2. Results of the Student *t* tests for equality between the number of worms attracted to each stimulant of a tested pair.

Experiment	Stimulant	$\bar{X} \pm SE^2$	Stimulant	$\bar{X} \pm SE^2$	n	P
1	Dark	36.4 ± 1.1	Light	26.3 ± 1.1	10	P<0.001
2	Oysters	37.0 ± 2.1	Sea water	23.0 ± 2.1	5	P=0.028
3	Oysters	42.1 ± 2.5	Mussels	12.5 ± 1.3	10	P<0.001
4	Oysters	33.7 ± 3.1	Clams	18.0 ± 2.6	10	P=0.020
5	Mucus	37.4 ± 2.2	Body (no gills)	21.2 ± 2.0	10	P=0.004
6	Mucus	32.5 ± 2.2	Gills	26.0 ± 2.2	10	P=0.174

<sup>1</sup> average number of worms attracted to a given stimulant

<sup>2</sup> standard error on the mean

**Table 3. P-values for the Tukey multiple comparisons test based on the data using the four-well glass chambers (experiment 7).**

	Mucus	Gills	Gills (mucus removed)	Sea water
Mucus	1.000	0.187	0.002	0.000
Gills	0.187	1.000	0.149	0.001
Gills (mucus removed)	0.002	0.149	1.000	0.086
Sea water	0.000	0.001	0.086	1.000

## CHAPITRE 2 - DISTRIBUTION DU TURBELLARIÉ *URASTOMA CYPRINAE* SUR LES BRANCHIES DE L'HUÎTRE *CRASSOSTREA VIRGINICA*

### 1. Résumé en français

*Urastoma cyprinae* est un turbellarié retrouvé à l'état libre, mais plus fréquemment, il est associé aux branchies de plusieurs espèces de bivalves. Au Canada atlantique, *U. cyprinae* est le plus souvent identifié chez l'huître *Crassostrea virginica*.

Des études récentes ont démontré que *U. cyprinae* peut induire une réaction pathologique au niveau des branchies de son hôte (Robledo *et al.* 1994). Les résultats du Chapitre 1 ont démontré que le turbellarié est fortement attiré par le mucus qui recouvre les branchies des huîtres. De plus, Fleming (1986) a suggéré que le ver se nourrit activement de cette substance. Ces indications nous laisse croire qu'il est peu probable que *U. cyprinae* est simplement un commensal, tel que suggéré par d'autres chercheurs (Burt et Drinnan 1968).

L'importance du mucus dans le traitement des particules sur les branchies de bivalves suspensivores a été établie (Ward *et al.* 1993, Ward 1996). Il a été démontré que des caractéristiques du flux du mucus, telles que la viscosité, la composition et la vitesse varient selon la région branchiale. Ayant déjà confirmé que *U. cyprinae* est attiré par le mucus de l'huître (Brun *et al.* 1999), et que possiblement le ver se nourrit de cette substance (Fleming 1986), l'objectif de la présente étude est d'examiner la distribution d'*U. cyprinae* sur les branchies de l'huître, tout en tenant compte des caractéristiques du mucus associées avec différentes régions branchiales.

Pour chaque huître, la lamelle ascendante et descendante de chacune des quatre demibranches a été divisée en trois zones: ventrale, médiane et dorsale. En se basant sur

des mesures de longueur et de largeur des lamelles, la surface branchiale occupée par chacune des trois zones était de 10, 80, et 10% respectivement.

Les résultats démontrent qu'*U. cyprinae* est retrouvé en plus grand nombre dans la zone dorsale comparé aux zones ventrales et médianes. Afin d'expliquer ce phénomène, les hypothèses suivantes sont avancées dans l'article scientifique qui suit.

- 1) Le mucus du sillon dorsal est moins visqueux que celui du sillon ventral, suggérant que le mucus du sillon dorsal est beaucoup plus accessible pour les activités de *U. cyprinae*. De plus, si le tégument joue un rôle actif dans l'acquisition et le transfert des nutriments, tel que suggéré par certains auteurs, les régions dorsales représentent donc des sites idéaux permettant un contact intime entre le corps de *U. cyprinae* et le flux du mucus.
- 2) Si l'on considère que *U. cyprinae* ne se nourrit pas uniquement du mucus, mais aussi des particules capturées dans le mucus, la préférence des vers pour la zone dorsale des branchies peut être envisagée, puisque le matériel présent est de meilleure qualité nutritive par rapport au matériel de la zone ventrale.

## 2. Article scientifique

### **DISTRIBUTION OF THE TURBELLARIAN *URASTOMA CYPRINAE* ON THE GILLS OF THE EASTERN OYSTER *CRASSOSTREA VIRGINICA***

**NICOLE T. BRUN<sup>1</sup>, ANDREW D. BOGHEN<sup>1</sup>  
and JACQUES ALLARD<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Département de Biologie, Université de Moncton  
Moncton, Nouveau-Brunswick, Canada E1A 3E9

<sup>2</sup>Département de Mathématiques et Statistiques, Université de Moncton  
Moncton, Nouveau-Brunswick, Canada E1A 3E9

Short Running Title: Distribution of *Urastoma cyprinae* on Gills of Oysters

Key Words: *Urastoma cyprinae*, turbellaria, eastern oyster, *Crassostrea virginica*, gills, oyster mucus

## ABSTRACT

*Urastoma cyprinae* has been reported from the gills of various bivalve species. In Atlantic Canada it has been identified in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Recent studies have demonstrated that *U. cyprinae* can cause serious alterations to gill tissue in mussels. It has been suggested that, in oysters, the worm feeds on mucus secreted by the gills. Our work has revealed that *U. cyprinae* is attracted to oysters and that the source of attraction is mucus. The current study focuses on the distribution of *U. cyprinae* on the gills of oysters in relation to the presence and the state of mucus from different regions of the gills. Findings demonstrate that the worms occur throughout the gill surface, but that they are most heavily concentrated along the basal food tract, the major pathway for the transport of food particles to the labial palps. If mucus plays an important role in the parasite's survival, then *U. cyprinae's* preference for this location may be a way of ensuring intimate contact between itself and the mucus slurry characterising this site.

## INTRODUCTION

*Urastoma cyprinae* Graff occurs as a free-living organism in mud and algae (Marcus 1951, Westblad 1955) and on the gills of various molluscan bivalves (Fleming *et al.* 1981, Goggin and Cannon 1989, Noury-Sraïri *et al.* 1990, Murina and Solonchenko 1991, Teias dos Santos and Coimbra 1995, Trotti *et al.* 1998). In Atlantic Canada, the "gill-worm" has been reported in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Burt and Drinnan 1968, Fleming *et al.* 1981, Bohen *et al.* 1993).

Robledo *et al.* (1994) have shown that *U. cyprinae* can induce pathological changes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, resulting in disorganisation of gill filaments and infiltration of hemocytes. Brun *et al.* (in press) have demonstrated that *U. cyprinae* is strongly attracted to the mucus that coats the gills of oysters, and Fleming (1986) has suggested that the worm may actively feed on this substance. Such findings bring into question to what extent *U. cyprinae* is a facultative commensal, as has previously been suggested (Burt and Drinnan 1968).

The role of mucus in particle processing of bivalves has been studied extensively (Ward *et al.* 1993, Ward *et al.* 1994, Ward 1996, Beninger and St-Jean 1997). The attraction of *U. cyprinae* to mucus may depend on such factors as its viscosity, composition, and transport velocity, which vary significantly between different areas of the gills (Ward *et al.* 1993, Ward 1996). Considering the affinity of *U. cyprinae* to mucus Brun *et al.* (in press) and the possibility that the worm feeds on this substance (Fleming 1986), a comparative study of its attraction to different regions of the gills where mucus is present in a form that is most readily accessible, becomes an interesting consideration. In this paper, we examine the distribution of *U. cyprinae* on the gills of oysters in relation to

some of the characteristics of the mucus on the on the different parts of the gills, as mentioned above.



## MATERIALS AND METHODS

Twenty adult oysters infected with *U. cyprinae* were collected from Shippagan Bay (New Brunswick, Canada) on October 8, 1997. The animals were transported to the Université de Moncton on ice and were kept at 6°C in a walk-in cold room for 2 days prior to the start of the study.

Of the 20 molluscs collected, five oysters were randomly chosen, and their right valves removed (Fig. 1). The animals were individually dipped into liquid nitrogen (-196°C) for 30 s, which allowed immediate sacrifice of both oysters and worms. At the same time it immobilized *U. cyprinae* in their respective positions on the gills, thereby facilitating worm counts at the specific location where they occurred.

The oyster lamellae were divided into three zones: ventral, medial, and dorsal, from which *U. cyprinae* were identified and counted (Fig. 2). These zones generally correspond to the gill regions of bivalves occasionally referred to by other authors (Ward *et al.* 1993, Ward *et al.* 1994, Ward 1996, Beninger and St-Jean 1997). The surface area occupied by each of the three zones for each lamella was determined by measuring its length and width (Fig. 2). Based on these measures, boundaries were delineated such that the dorsal zone, representing the area beginning at the basal food tract and extending towards the ventral axis of the oyster, would occupy 10% of the surface of the lamella. The medial zone, commencing at the lower limit of the dorsal zone towards the ventral axis, represented 80% of the surface of the lamella, while the ventral zone, stretching from the lower limit of the medial zone to the marginal indentation of the marginal food groove, occupied the remaining 10% (Fig. 2). Both the ascending and the descending sides of the

basal and ventral tracts were examined and treated as separate zones for each of the lamellae. The combined surface areas, therefore, occupied by all eight ventral, eight medial, and eight dorsal zones were 10, 80, and 10%, respectively, for each of the five oysters. In our study, the mantle area was not used for determining the counting zones or for the calculation of worm numbers.

Each oyster was partially thawed and examined in a semi-frozen state using an Olympus SZ30 stereomicroscope. This condition ensured a minimum dislodging of the worms from their point of attachment on the gills during examination. Worm counts were conducted on successive demibranchs from each of the zones as defined above, using a hand-held counter, starting with the demibranch immediately adjacent to the right mantle (Fig. 1).

A log-linear model (Agresti 1990) was employed using Systat<sup>®</sup> 8.0 for Windows<sup>®</sup> (SPSS 1998) to analyze the worm counts as a function of three factors: oysters, zones, and lamellae, and their interactions. This analysis allows the user to identify significant factors and estimate their importance with an adequate control of Type I error. The alternative would be for the user to employ numerous chi-square tests on separate contingency tables, but with less control on the overall probability of error. For factors found to be significant in the log-linear model, the results of chi-square tests are given as a simple measure of significance.

In the log-linear model, the Pearson chi-square and the likelihood-ratio test are used to identify the most significant factors and the *Raftery's* BIC (Bayesian Information Criterion) is employed to select the most appropriate model. The model is reported in a

multiplicative form as follows:  $F_{ijk} = F_0 m_i m_j m_k m_{ij} m_{ik} m_{jk} m_{ijk}$ , where  $i$  represents the oysters,  $j$  the zones, and  $k$  the lamellae.  $F_0$  is the reference frequency, while  $m$  represents the effects. An estimated  $m$  value close to 1 suggests that the effect of the individual factor or the interaction between two factors is small. The standard scores  $[\lambda/\text{se}(\lambda)]$  for the parameters of the additive expression of the model ( $\ln F_{ijk} = \theta + \lambda_i + \lambda_j + \lambda_k + \lambda_{ij} + \lambda_{ik} + \lambda_{jk}$ ) were calculated and used with the Bonferroni correction test to determine their significance. However, for the sake of conciseness, they are only reported as required for analysis. For each position, the counts for all oysters were added. These total counts were arranged in a simple 2-way table (zones x lamellae) and analyzed using the chi-square test (Zar 1984). To make comparison with other studies easier, mean counts per oyster are reported.

## RESULTS

Grouped box and whisker plots (Figure 3) represent the observed worm counts graphically. The level of infection/parasitism for the five individual oysters are 513, 514, 507, 279 and 466 respectively. The results of the log-linear model indicate that the test of fit is significant for both the Pearson chi-square ( $\chi^2 = 189.3735$ ,  $df = 56$ ,  $p < 0.000005$ ) and the likelihood-ratio test ( $\chi^2 = 199.4746$ ,  $df = 56$ ,  $p < 0.000005$ ). A triple interaction factor  $m_{ijk}$  was removed because it was nonsignificant. The model retained, therefore, is  $F_{ijk} = F_0 m_i m_j m_k m_{ij} m_{ik} m_{jk}$  with a *Raftery's* BIC value of - 233.4889.

Table 1 shows that the three factors and their respective interactions are significant. The variable having the greatest impact on worm numbers is the zones ( $\chi^2 = 1208.88$ ). When considering the multiplicative effects for the latter, the results in Table 2 indicate that the worms are more abundant in the dorsal zones of the gills (2.688) compared to the medial (1.345) and ventral (0.276) zones, respectively. The standard scores for the additive expression of the model show that each value within the zones is highly significant: ventral (- 20.054); medial (6.881); and dorsal (25.246). In most instances, the multiplicative effects of the other two factors as well as all the interactions are close to 1, except for a few values (Table 2) which represent particularly low or high worm counts.

Table 3 shows the mean number of worms observed and expected for each position. The results of the chi-square test comparing the total (5 x mean number) number of worms observed with the expected number of worms observed at each position indicate that *U. cyprinae* are more numerous along the dorsal zones compared to the medial and ventral zones. This is reflected by the total number of worms counted in each of the three zones: dorsal (1404), medial (727), ventral (148). Differences in percentages between the

observed and expected worm counts further underline the preponderance of *U. cyprinae* in the dorsal versus the medial and ventral zones (Table 3).

## DISCUSSION

Previous studies have shown that *U. cyprinae* are highly attracted to mucus on the gills of oysters Brun *et al.* (in press). Mucus is secreted by pallial organs and plays a predominant role in activities associated with bivalve-suspension feeding (Ward *et al.* 1994, Ward 1996).

The use of mapping for distinguishing between particular regions of pallial surfaces has previously been applied in studies on mucocyte identification in bivalves (Beninger *et al.* 1993, Beninger and St-Jean 1997). The current work employed the principle of gill mapping to determine whether there existed a relationship between infestation levels of *U. cyprinae* and specific areas on the gills. This approach contrasts with previous investigations on oysters (Fleming *et al.* 1981, Fleming 1986) and other species such as mussels (Robledo *et al.* 1994, Teias dos Santos and Coimbra 1995, Trotti *et al.* 1998), which reported the occurrence of the parasite in the host without specific reference to a niche.

Statistical analyses of three variables (oysters, zones, lamellae) and the interactions between them, demonstrated that it was the zones that exerted the greatest influence on the distribution of *U. cyprinae*. It was also noted, that the highest numbers of worms were consistently found along the dorsal regions compared to the medial and ventral zones. Having already established that *U. cyprinae* display a strong attraction for mucus Brun *et al.* (in press), the existing situation raises the question as to why there is such a marked preference for the dorsal zones. Several possible explanations could be proposed.

Mucus contained in the basal food tract consists primarily of mixed

mucopolysaccharides (acid and neutral), whereas, the marginal food groove is mostly constituted of acid-dominant mucopolysaccharides (Beninger and St-Jean 1997). As a result, trapped particles in the dorsal regions are transported in a low-viscous mucus slurry (Ward 1996), at a velocity of more than twice that occurring in the ventral grooves (Ward *et al.* 1993). This differs with the material in the marginal food grooves, which is contained in a viscous mucus cord (Ward *et al.* 1994). The likelihood that the worms prefer to be in contact and possibly feed on the more "fluid" mucus in the dorsal zones is an attractive prospect, both from the point of accessibility and ease of uptake.

*Urastoma cyprinae* possesses an oral-genital pore located in the posterior end (Cannon 1986), and a tegument that takes the form of a ciliated epithelium (Schmidt and Roberts 1989, Noury-Sraïri *et al.* 1990). Although *U. cyprinae* obviously feeds with its oral-genital pore, the tegument may also play an important role in food acquisition and the transfer of material across the body wall (Noury-Sraïri *et al.* 1990). The dorsal regions may, therefore, represent choice sites where extensive contact between the body of *U. cyprinae* and the fast-moving, "fluid" mucus slurry prevails.

In the oyster, the basal food tract is the predominant route for transportation of food in preparation for final sorting and ingestion (Ward *et al.* 1998). In contrast, mucus-bound particles contained in the marginal grooves may have a lower nutritional value (Ward *et al.* 1998) and are generally rejected as pseudofaeces (Newell and Langdon 1996, Ward 1996). If one assumes that the worms do not feed solely on the mucus, but also rely on particles bound in the mucus, then *U. cyprinae*'s preference for the dorsal regions, where high-quality nutritional materials are present, can be expected. The dorsal regions may also provide added protection for the worms, because the latter would be less

vulnerable to water currents when the oyster's valves are open. Finally, given the fact that *U. cyprinae* are negatively phototactic (Burt and Bance 1981, Pike and Wink 1986), the dorsal regions may also provide the worms with a darker environment compared to the ventral regions. Morphological and behavioural studies are presently under way to better understand the parasite's adaptations and possible host-parasite interactions in the dorsal regions of the oyster's gills.



## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. J. E. Ward (Department of Marine Sciences, University of Connecticut, CT, USA), Dr. S. Reebbs (Département de Biologie, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada), Dr. M. D. B. Burt (Huntsman Marine Science Centre, St. Andrews, NB, Canada) and Dr. B. A. MacDonald (Department of Biology, University of New Brunswick, Saint John, NB, Canada), for reviewing our manuscript and for their helpful comments and suggestions. The authors would also like to thank Dr. P. Ashrit (Département de Physique, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada) for all his helpful comments. Financial support to the senior author was provided in part by the Faculty of Research and Graduate Studies of the Université de Moncton. This project is part of the Richibucto Environmental and Resource Enhancement Program.

## REFERENCES

- Agresti, A. 1990. Categorical data analysis. New York: Wiley-Interscience. 558 pp.
- Beninger, P.G. & S.D. St-Jean. 1997. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding bivalves: unifying principles. *Mar. Biol.* 129:389-397.
- Beninger, P.G., S. St-Jean, Y. Poussart & E. Ward. 1993. Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 98:275-282.
- Boghen, A.D., J. Allard & E. Bataller. 1993. Rapport final et recommandations sur le programme de monitoring pour la côte est du Nouveau-Brunswick, Centre de recherche en sciences de l'environnement. Université de Moncton, Moncton, Nouveau-Brunswick, 76 pp.
- Brun, N.T.B., A.D. Boghen & J. Allard. in press. Attraction of *Urastoma cyprinae* Graff, 1882 (Turbellaria: Urastomidae) to the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.*
- Burt, M.D.B. & G.W. Bance. 1981. Ultrastructure of the eye of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria, Alloeocoela). *Hydrobiologia* 84:276.
- Burt, M.D.B. & R.E. Drinnan. 1968. A microturbellarian found in oysters off the coast of Prince Edward Island. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 25(11):2521-2522.
- Cannon, L.R.G. 1986. Turbellaria of the World- A Guide to Families & Genera. Queensland Museum. Brisbane, Australia. 132 pp.
- Fleming, L.C. 1986. Occurrence of symbiotic turbellarians in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Hydrobiologia* 132:311-315.
- Fleming, L.C., M.D.B. Burt & G.B. Bacon. 1981. On some commensal Turbellaria of the Canadian East Coast. *Hydrobiologia* 84:131-137.
- Goggin, C.L. & L.R.G. Cannon. 1989. Occurrence of a turbellarian from Australian tridacnid clams. *Int. J. Parasitol.* 19(3):345-346.
- Marcus, E. 1951. Turbellaria Brasileiros (9). Boletins da faculdade filosofia ciencias e letras, Universidade Sao Paulo. *Zoologia* 16:5-215.
- Murina, G.V. & A.I. Solonchenko. 1991. Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea: *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) and *Polydora ciliata* (Polychaeta). *Hydrobiologia* 227:385-387.

- Newell, R.I.E. & C.J. Langdon. 1996. Mechanisms and physiology of larval and adult feeding. pp. 185-229 in *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. V.S. Kennedy, R.I.E. Newell & A.F. Eble (eds.). Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland.
- Noury-Sraïri, N., J.L. Justine & L. Euzet. 1990. Ultrastructure du tégument et des glandes sous-épithéliales de *Urastoma cyprinae* («Prolecithophora»), Turbellarié parasite de Mollusque. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie*, 13<sup>e</sup> Série 11:53-71.
- Pike, A.W. & R. Wink. 1986. Aspects of photoreceptor structure and phototactic behaviour in Platyhelminthes, with particular reference to the symbiotic turbellarian, *Paravortex*. *Hydrobiologia* 132:101-104.
- Robledo, J.A.F., J. Cáceres-Martínez, R. Sluys & A. Figueras. 1994. The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. *Dis. Aquat. Org.* 18:203-210.
- Schmidt, G.D. & L.S. Roberts. 1989. *Foundations of Parasitology*. Time Mirror/Mosby College Publishing. St. Louis, Missouri. 750 pp.
- SPSS Inc. (1998) *Systat<sup>®</sup> 8.0 for Windows<sup>®</sup>*: new statistics. Chicago. 1086 pp.
- Teias dos Santos, A.M, & J. Coimbra. 1995. Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L., in Ria de Aveiro: gonad symbiotic infestation. *Aquaculture* 132:195-211.
- Trotti, G.C., E.M. Baccarani, S. Giannetto, A. Giuffrida & F. Paesanti. 1998. Prevalence of *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Dis. Aquat. Org.* 32:145-149.
- Ward, J.E. 1996. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing, and fate. *J. Invert. Biol.* 115(3):218-231.
- Ward, J.E., J.S. Levinton, S.E. Shumway & T. Cucci. 1998. Particle sorting in bivalves: in vivo determination of the pallial organs of selection. *Marine Biology* 131:283-292.
- Ward, J.E., B.A. MacDonald & R.J. Thompson. 1993. Mechanisms of suspension feeding in bivalves: Resolution of current controversies by means of endoscopy. *Limnol. Oceanogr.* 38(2):265-272.
- Ward, J.E., R.I.E. Newell, R.J. Thompson & B.A. MacDonald. 1994. *In Vivo* Studies of Suspension-Feeding Processes in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol. Bull.* 186:221-240.
- Westblad, E. 1955. Marine "Alloeoceols" (Turbellaria) from North Atlantic and Mediterranean coast. *Arkiv för Zoologi* 7(24):491-526.

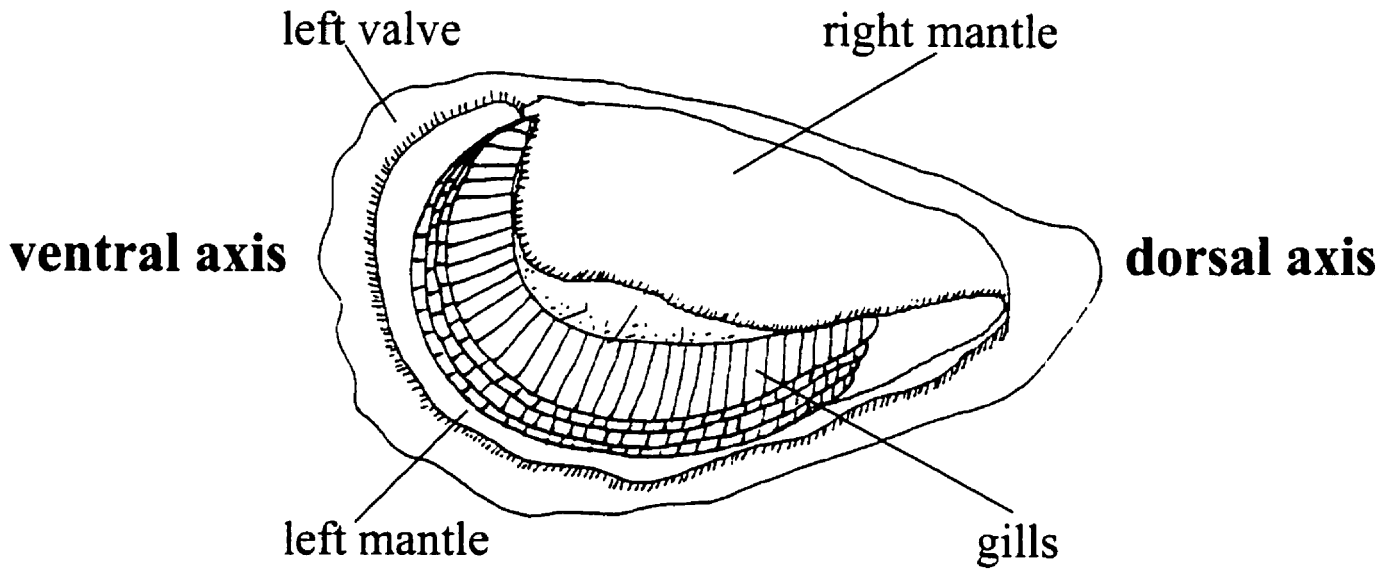
Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis 2nd ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.

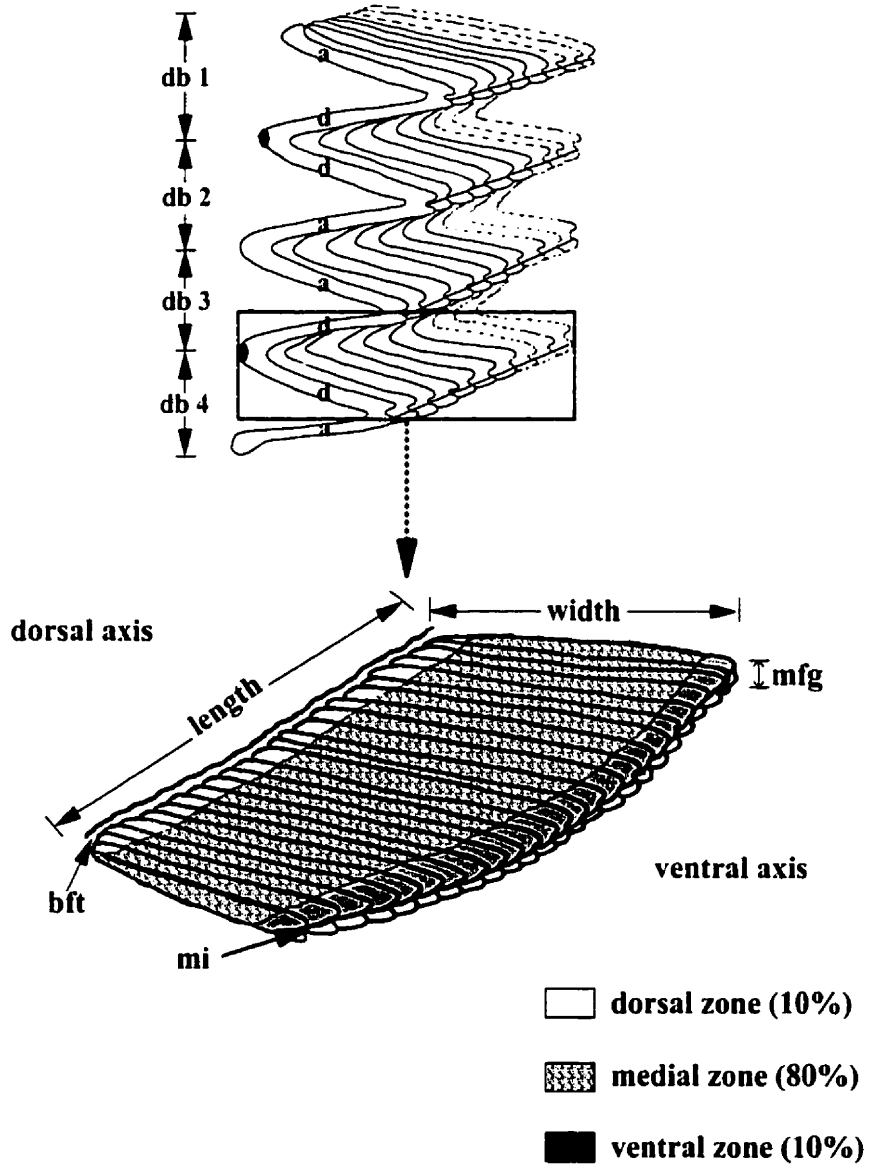
## Figure Legends

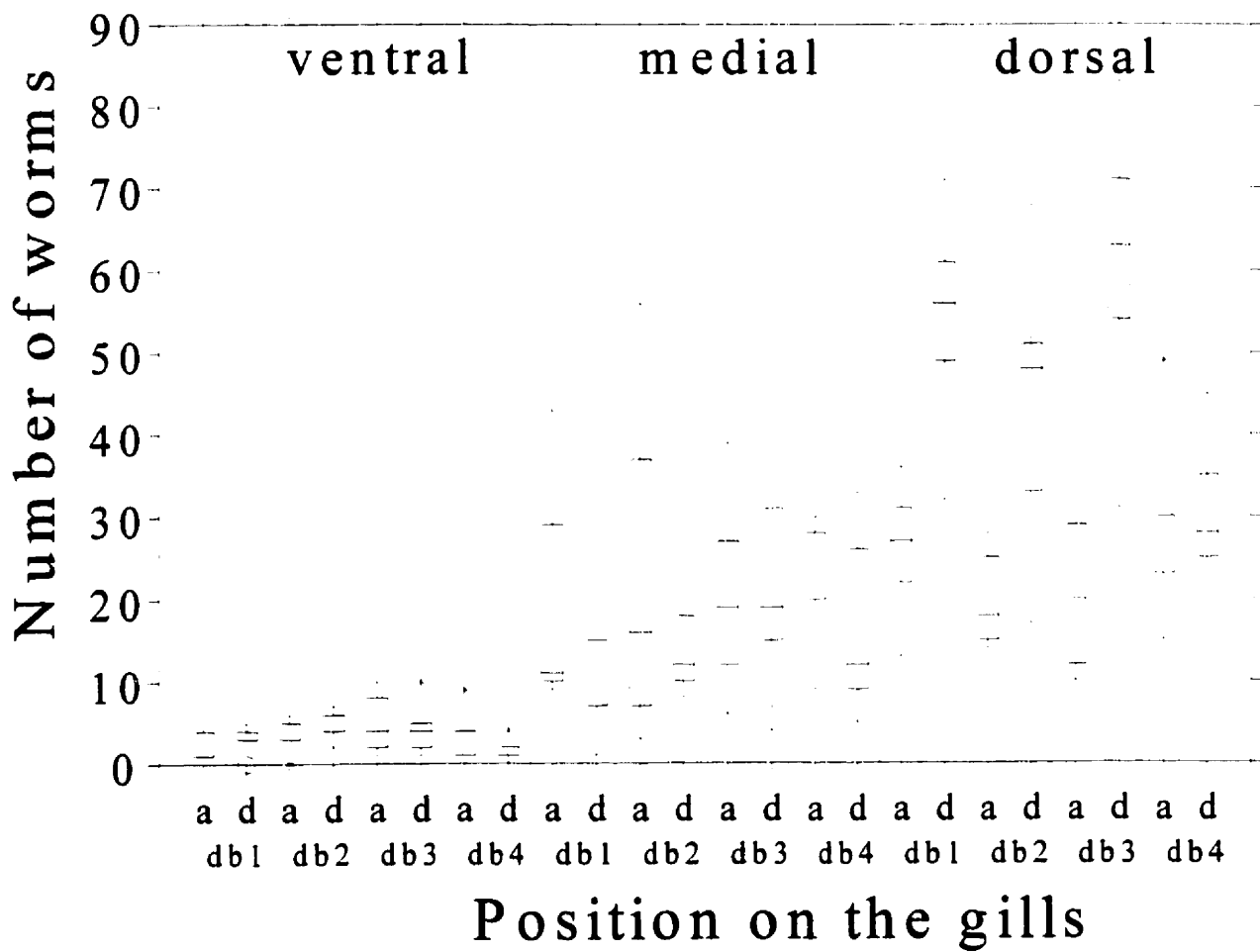
Figure 1. Schematic diagram of the oyster, after removal of the right valve, displaying the dorsal and ventral axes, left mantle, and raised right mantle exposing the gills.

Figure 2. Schematic diagram of the four gill demibranchs of an oyster displaying the ascending and descending lamellae. Enlargement of area in rectangle to show details of one of the two lamellae forming an oyster demibranch. Each lamella is divided into three zones from which *Urastoma cyprinae* were counted: ventral, medial and dorsal. The shaded areas, with corresponding percentages, represent the surface area of the lamella occupied by each zone (10, 80, and 10%, respectively). (a) ascending lamella (bft) basal food tract, (d) descending lamella, (db1) demibranch 1, (db2) demibranch 2, (db3) demibranch 3, (db4) demibranch 4, (mfg) marginal food groove, (mi) marginal indentation

Figure 3. Box and whiskers plot representing the number of worms observed in oysters for each of the counting zones (ventral, medial, dorsal) of the ascending and descending lamellae for the four demibranchs. Due to the small number of oysters sampled, it is possible to identify single counts in most cases from the box and whiskers plot.









**Table 1. Results of the log-linear model analysis.**

<b>Term Tested</b>	<b>The model without the Term</b>				<b>Removal of term from model</b>		
	<b>Ln (MLE)</b>	<b>Chi-Sq</b>	<b>df</b>	<b>p-value</b>	<b>Chi-Sq</b>	<b>df</b>	<b>p-value</b>
<b>Oysters</b>	- 388.580	275.72	60	0.0000	76.25	4	0.0000
<b>Zones</b>	- 855.156	1208.88	58	0.0000	1009.40	2	0.0000
<b>Lamellae</b>	- 363.095	224.75	63	0.0000	25.28	7	0.0007
<b>Zones-oysters</b>	- 377.011	252.59	64	0.0000	53.11	8	0.0000
<b>Lamellae-oysters</b>	- 419.180	336.92	84	0.0000	137.45	28	0.0000
<b>Zones-lamellae</b>	- 441.028	380.62	70	0.0000	181.15	14	0.0000

**Table 2. Multiplicative effects for each of the three factors and their interactions, where m represents effects, i the oysters, j the zones, and k the lamellae. The calculated reference frequency ( $F_0$ ) is valued at 11.516. Values significantly different from 1 are indicated in boldface. (a) Multiplicative effects for each of the five oysters. (b) Multiplicative effects for the three counting zones. Multiplicative effects for the four ascending [a] and four descending [d] lamellae. (c) Multiplicative effects for the interactions between the oysters and the zones. (d) Multiplicative effects for the interactions between the oysters and the lamellae. (e) Multiplicative effects for the interactions between the oysters and the lamellae. (f) Multiplicative effects for the interactions between the zones and the lamellae.**

(a)	$m_i$				
	1	2	3	4	5
	1.257	1.355	1.049	<b>0.571</b>	0.981

(b)	$m_j$		
	ventral	medial	dorsal
	0.276	1.345	<b>2.688</b>

(c)	$m_k$							
	1a	1d	2a	2d	3a	3d	4a	4d
	0.974	0.888	0.912	1.200	1.018	1.346	1.060	0.727

(d)	$m_{ij}$				
	1	2	3	4	5
ventral	1.009	1.264	0.800	0.987	0.992
medial	1.122	1.134	1.099	0.747	0.958
dorsal	0.883	0.698	1.137	<b>1.357</b>	1.053

(e)	$m_{ik}$				
	1	2	3	4	5
1a	0.804	0.981	0.644	1.334	<b>1.478</b>
1d	0.851	1.209	1.127	0.736	1.171
2a	1.330	<b>1.499</b>	0.731	1.006	0.682
2d	0.825	0.609	1.229	<b>1.510</b>	1.073
3a	0.990	1.062	1.165	1.016	0.810
3d	0.963	1.151	0.867	0.688	1.150
4a	1.183	0.981	0.938	0.894	1.029
4d	1.181	0.771	<b>1.631</b>	1.073	0.627

(f)	$m_{jk}$		
	1	2	3
1a	0.950	1.266	0.831
1d	0.939	0.567	<b>1.878</b>
2a	1.037	1.382	0.675
2d	1.304	0.687	1.116
3a	1.369	1.175	0.621
3d	0.888	0.821	1.371
4a	1.029	1.163	0.835
4d	0.640	1.307	1.196

**Table 3. Observed and expected mean number of worms for each of the three zones (ventral, medial, dorsal), and the differences in percentages between them for the ascending (a) and descending (d) lamellae for the four demibranchs (db). Negative values indicate an observed worm count lower than expected; positive values demonstrate a higher one.**

	<b>Zones</b>															
	<b>Lamellae</b>				<b>Ventral</b>				<b>Medial</b>				<b>Dorsal</b>			
	Observed mean $\pm$ SE <sup>a</sup>	Expected mean	Difference (%)	Observed mean $\pm$ SE <sup>a</sup>	Expected mean	Difference (%)	Observed mean $\pm$ SE <sup>a</sup>	Expected mean	Difference (%)	Observed mean $\pm$ SE <sup>a</sup>	Expected mean	Difference (%)	Observed mean $\pm$ SE <sup>a</sup>	Expected mean	Difference (%)	
<b>db 1 a</b>	3.2 $\pm$ 1.0	5.6	-43	20.4 $\pm$ 6.7	45.6	-55	25.8 $\pm$ 3.9	5.6	+361							
<b>db 1 d</b>	3.0 $\pm$ 0.8	5.6	-46	9.0 $\pm$ 2.7	45.6	-80	53.8 $\pm$ 6.5	5.6	+861							
<b>db 2 a</b>	5.0 $\pm$ 0.9	5.6	-11	13.2 $\pm$ 2.1	45.6	-71	43.4 $\pm$ 8.6	5.6	+257							
<b>db 2 d</b>	3.8 $\pm$ 1.1	5.6	-32	23.8 $\pm$ 10.0	45.6	-48	20.0 $\pm$ 2.8	5.6	+675							
<b>db 3 a</b>	4.8 $\pm$ 1.9	5.6	-14	20.6 $\pm$ 5.8	45.6	-55	20.0 $\pm$ 4.0	5.6	+257							
<b>db 3 d</b>	4.4 $\pm$ 1.6	5.6	-21	20.0 $\pm$ 5.1	45.6	-56	60.4 $\pm$ 8.8	5.6	+979							
<b>db 4 a</b>	1.6 $\pm$ 0.7	5.6	-71	17.0 $\pm$ 5.3	45.6	-63	29.4 $\pm$ 5.2	5.6	+425							
<b>db 4 d</b>	3.8 $\pm$ 1.5	5.6	-32	21.4 $\pm$ 3.7	45.6	-53	28.0 $\pm$ 5.8	5.6	+400							
	<b>3.7 <math>\pm</math> 0.4</b>			<b>18.2 <math>\pm</math> 2.0</b>			<b>35.1 <math>\pm</math> 3.0</b>									

<sup>a</sup>Standard error on the mean.

### **CHAPITRE 3 – VARIATIONS DES PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DES PROTÉASES DU MUCUS BRANCHIAL DE L’HŪÎTRE *CRASSOSTREA VIRGINICA* EN RÉPONSE À L’INFESTATION PAR LE TURBELLARIÉ *URASTOMA CYPRINAE***

#### **1. Résumé en français**

*Urastoma cyprinae* est retrouvé sur les branchies de certains bivalves, y incluant l’huître *Crassostrea virginica*. Bien que *U. cyprinae* provoque des réactions pathologiques chez les moules, aucun effet similaire n’a été observé pour les huîtres. Néanmoins, il a été suggéré qu’une présence élevée de *U. cyprinae* chez les huîtres semble être inversement corrélée avec l’indice de condition physiologique des bivalves et pourrait donc affecter la santé de ces derniers. *U. cyprinae* a démontré une forte attraction envers le mucus sécrété par les branchies de l’huître et il a été avancé que cette substance joue un rôle important dans l’alimentation du ver.

Il est donc raisonnable de supposer que certaines des interactions entre *U. cyprinae* et l’huître ont lieu dans le mucus sécrété par les branchies. Des études ont été menées afin de déterminer si la présence de *U. cyprinae* pourrait affecter les profils électrophorétiques du mucus branchial de l’huître en utilisant des protéases comme indicateurs biochimiques.

Les résultats ont démontré que le mucus d’huître contient trois protéases : une protéase acide (96 kDa), une métalloprotéase (64 kDa) et une protéase sérine (33 kDa). Les résultats des expériences utilisant le mucus provenant d’huîtres infectées et non infectées, ainsi que celles utilisant le mucus lyophilisé incubé avec *U. cyprinae* ont confirmé que la présence du ver modifie la composition des protéases du mucus branchial.

La présente recherche a révélé que *U. cyprinae* et le mucus de l'huître sécrètent tous les deux des protéases. Bien que les rôles précis de ces enzymes n'ont pas encore été définis, il a été proposé qu'une des fonctions serait de participer dans les activités de digestion de *U. cyprinae*.

2. Article scientifique

**CHANGES IN THE ELECTROPHORETIC PROFILES OF GILL MUCUS  
PROTEASES OF THE EASTERN OYSTER *CRASSOSTREA VIRGINICA* IN  
RESPONSE TO INFECTION BY THE TURBELLARIAN  
*URASTOMA CYPRINAE***

Nicole T. Brun<sup>1</sup>, Neil W. Ross<sup>2</sup> and Andrew D. Boghen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de Biologie, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada, E1A 3E9

<sup>2</sup>Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, 1411 Oxford St.,  
Halifax, NS, Canada, B3H 3Z1

## SUMMARY

*Urastoma cyprinae* occurs on the gills of various bivalves species, including the eastern oyster *Crassostrea virginica*. While the worm is known to cause severe gill disruption in mussels, no evidence of this nature has been described for oysters. Nonetheless, high levels of *U. cyprinae* have been reported in oysters, which may, in turn, reduce the oyster's overall condition. Furthermore, *U. cyprinae* is strongly attracted to oyster gill mucus, which is suggested to play an active role in the worm's feeding activities. It follows, that some of the interactions between *U. cyprinae* and oysters take place in host gill mucus. Studies were undertaken to determine if the presence of *U. cyprinae* altered the electrophoretic profiles of oyster gill mucus, using proteases as indicators. Findings reveal that oyster gill mucus contains three proteases, a putative acid protease at 96 kDa, a zinc metalloprotease at 64 kDa and a serine protease at 33 kDa. Results based on experiments using mucus preparations extracted from infected and non-infected oysters, along with those using lyophilized mucus incubated with live *U. cyprinae* confirm that the presence of *U. cyprinae* alters the protease composition of gill mucus. The present data demonstrates that both *U. cyprinae* and host gill mucus actively secrete proteases. While the precise roles of these enzymes still need to be defined, one of their functions may be associated with digestion-related activities induced by the worm.

SHORT RUNNING TITLE : Changes in oyster gill mucus proteases in response to  
*U. cyprinae*

KEY WORDS : *Urastoma cyprinae*, *Crassostrea virginica*, Turbellaria, eastern oyster,  
gills, mucus, proteases, SDS-PAGE electrophoresis



## INTRODUCTION

The turbellarian *Urastoma cyprinae* is commonly reported on the gills of various bivalves, including the commercially important eastern oyster *Crassostrea virginica* (Burt and Drinnan 1968, Fleming *et al.* 1981, Fleming 1986, Bogen *et al.* 1993). While studies on the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, have clearly demonstrated that the 'gill-worm' induces pathological reactions to host gill tissue (Robledo *et al.* 1994), no such evidence has been described for oysters infected with *U. cyprinae* (McGladdery *et al.* 1992, 1993, Bower *et al.* 1994). This notwithstanding, *U. cyprinae*, has been shown to display a marked preference for oysters compared to other molluscan species in Atlantic Canada (Brun *et al.* 1999a). The occasional high numbers as reported on the gills (Bogen *et al.* 1993) may possibly contribute to a reduction in overall oyster condition (Plourde *et al.* 1991). In addition, *U. cyprinae* is strongly attracted to the mucus secreted by oyster gills and is found to be most heavily concentrated along the basal food tract, where mucus is present in the form of a fast-moving slurry (Brun *et al.* 1999b). Such observations dispel the contention that the presence of *U. cyprinae* on the gills of oysters is accidental or simply commensalistic as has been previously suggested by Burt and Drinnan (1968). However, the nature of the specific interactions that define the host-parasite relationship between *U. cyprinae* and oysters remain to be elucidated.

Oyster gills represent the sites for attachment for *U. cyprinae*. More specifically, secreted gill mucus may play an important role in the feeding processes of the worm (Fleming 1986, Brun *et al.* 1999b). It follows, therefore, that some of the biological

interactions between *U. cyprinae* and its molluscan host may occur in the oyster gill mucus and, therefore, warrant investigation.

Previous studies have suggested that parasite-derived proteolytic enzymes are important factors in adhering to host cells (Avila and Calderon 1993), facilitating penetration and/or the digestion of host tissues (Sung and Dresden 1986, McKerrow 1987 and 1989, Knox and Jones 1990, White *et al.* 1996, Berasain *et al.* 1997, Perkins *et al.* 1997) and in the evasion of host immune responses (Ellis *et al.* 1990, Kamata *et al.* 1995, Garreis *et al.* 1996). Alternatively, host mucus contains a multitude of active components, including hemolysins, lysozymes, agglutinins, lectins, and proteases, which have been suggested or proven to play important roles in host defense mechanisms of vertebrates and invertebrates (Cornick and Stewart 1968, Ingram 1980, Ellis 1981, Hjelmeland *et al.* 1983, Fisher and DiNuzzo 1991, Alexander and Ingram 1992, Canicatti *et al.* 1992, Fisher 1992).

The objective of this study is to determine whether biochemical changes to oyster gill mucus occur as a result of infection by *U. cyprinae*, using proteases as indicators. More specifically, the effects of *U. cyprinae* on the electrophoretic profiles of mucus proteases are examined.

## MATERIALS AND METHODS

### *Collection and maintenance of oysters*

Between July and September 1997, 70 adult oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Urastoma cyprinae* were collected at low tide in Shippagan Bay (New Brunswick, Canada), in an area where the worms are known to occur. In addition, 35 suspension-grown adult oysters (free of *U. cyprinae*) were obtained from a major aquaculture operation in Atlantic Canada: Aquaculture Acadienne Ltd (Richibucto, NB, Canada). Both groups of molluscs were transported in separate plastic bags on ice to the Institute of Marine Biosciences (IMB) in Halifax (Nova Scotia, Canada), and maintained at 4°C for 72 hours.

### *Collection and maintenance of U. cyprinae (starved and fed animals)*

Oysters infected with *U. cyprinae* were opened under a dissecting microscope and were removed from the gills using a Pasteur pipette. The worms were maintained in 10 ml of filtered sea water (Whatman Qualitative filter paper < 11 µm, 25 ppt) at 6°C, which was replaced with a fresh solution every third day for a period of six weeks prior to the commencement of the experiments. These were considered to be 'starved' worms. Alternatively, 'fed' *U. cyprinae* were collected as described above, with the exception that the animals were removed from the gills within one hour of the beginning of experimentation.

### *Collection of fresh oyster gill mucus and preparation of lyophilized mucus*

Individual fresh mucus samples were carefully drawn from the gills of infected and/or non-infected oysters (depending on the experiment) using a Pasteur pipette. The mucus was subsequently filtered (0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter, 10 min at 3700 x g) to eliminate cells and particulate matter, and the samples were maintained in separate glass beakers on ice. Fresh mucus was tested within one hour of collection.

As well, mucus was collected from 10 non-infected oysters, pooled and filtered (0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter, 10 min at 3700 x g) to remove debris. The mucus was diluted 1:2 (v/v) with ammonium bicarbonate buffer (100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7.63), freeze-dried and stored at 4°C and 6°C as a lyophilized powder.

### *Preparation of gill mucus from infected and non-infected oysters for zymography and Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*

Fresh mucus samples were collected from the gills of six infected and six non-infected oysters as described above. Protein concentrations of the samples were determined by the dye-binding method as described by Bradford (1976) at 590 nm. The protein content of all the samples was adjusted to 0.3 mg/ml using filtered sea water, and diluted 1:1 (v/v) with 2x sample buffer (sample buffer = 2% SDS, 10% glycerol, 62 mM Tris-HCl pH 6.8). Ten microliter (10  $\mu\text{l}$ ) aliquots were prepared for both zymography and SDS-PAGE electrophoresis as described below.

### *Incubation of lyophilized mucus with live U. cyprinae*

Lyophilized mucus (10 mg) was dissolved in 2 ml of filtered sea water (25 ppt) to yield a mucus solution having a protein concentration of 0.2 mg/ml. Zymography was employed to compare changes in protease activity of mucus samples exposed to starved or fed *U. cyprinae*. Lyophilized mucus (250 µg) and approximately 20 live *U. cyprinae* were incubated in 200 µl sea water. Controls included isolated *U. cyprinae* in sea water as well as mucus in sea water only. The samples were incubated overnight at room temperature under dark conditions, then centrifuged (5 min at 3700 x g) to remove the worms, and 10 µl aliquots of the supernatants were prepared for zymography and electrophoresis. An identical experiment was also conducted using fresh mucus from non-infected oysters.

### *Whole cell extracts of U. cyprinae for zymography*

To compare protease activity of whole starved and whole fed *U. cyprinae*, approximately 40 starved or 40 fed worms were added to 200 µl filtered sea water (25 ppt) respectively. Both samples were centrifuged (10 min at 6400 x g) and the whole bodies of the animals were homogenized in 50 µl sample buffer. Zymography was performed using 10 µl aliquots of the enzyme solutions.

### *SDS-PAGE*

Electrophoretic analyses were carried out under denaturing conditions according to the method of Laemmli (1970). Ten microliter samples were diluted 1:1 (v/v) with 2x sample buffer with 50 mM dithiothreitol (DTT) and the samples were boiled for 2 minutes. Ten-microliter aliquots were run on 15% polyacrylamide gels at 200 V for approximately 1 hour (Bio-Rad Mini-PROTEAN® unit). After electrophoresis, the proteins in the gels were stained with 0.1% amido black in MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOH (45:45:10) or with silver stain (Swain and Ross 1995).

### *Zymography*

Zymography was used to characterize protease activity in the samples according to the method described by Hassel *et al.* (1996). The samples were mixed with equal amounts of 2x sample buffer without DTT and 10 µl aliquots were directly loaded onto a 12% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin. These were run at 4°C and 200 V for approximately 1 hour (Bio-Rad Mini-PROTEAN® unit). The gels were rinsed three times at room temperature with 2.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (wash buffer), and incubated overnight in the same buffer containing 50 mM MgCl<sub>2</sub> and 62.5 mM CaCl<sub>2</sub> (incubation buffer). Gels were stained in 0.1% amido black in MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOH (45:45:10) for 45 minutes to one hour and destained with MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOH (50:48:2).

### *Characterization of oyster mucus proteases*

To characterize the oyster gill mucus proteases, the remaining fresh mucus collected from the six non-infected oysters (as described above) was pooled (protein concentration 0.3 mg/ml) and five 10  $\mu$ l aliquots were processed using zymography with the addition of selected protease inhibitors. The gel was sliced into 5 strips which were incubated individually in the presence of either 40  $\mu$ g/ml aprotinin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 5 mM *o*-phenanthroline (Anachemia Chemicals LTd., Montreal, Toronto, Canada) or 5 mM iodoacetamide (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) in incubation buffer. One strip was incubated with 10 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) in wash buffer. Another strip served as control and was processed without inhibitors. After an overnight incubation at 30°C, the strips were stained with amido black and destained for several hours.

### *Molecular weight determinations on SDS-PAGE and zymography gels*

SDS-PAGE and zymography gels were calibrated with suitable molecular weight markers obtained from Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). The molecular weights of proteins or protease activity detected in the samples using zymography or SDS-PAGE electrophoresis were determined from a calibration curve.

## RESULTS

### *Mucus preparations from infected and non-infected oysters*

Zymography was employed to compare gill mucus protease activity between animals infected and non-infected with *U. cyprinae*. Proteases present in the gel are detected by clearing of the gelatin where they are found, resulting in clear bands against a blue background. Strong protease activity was detected at 96 kDa in four of six mucus samples taken from non-infected oysters (Fig. 1a, lanes 2-5). In contrast, only one of six mucus samples from infected oysters revealed the same 96 kDa band (Fig. 1a, lane 8). In addition, a 64 kDa protease band exhibiting very low activity was detected in several of the mucus samples from the non-infected oysters and in one of the samples taken from the infected animals. The nature of the positively-stained low molecular weight bands present in the gel (Fig. 1a) were not determined.

To verify that similar amounts of protein for each sample were loaded onto the gel following the adjustment of protein concentration (see Materials and Methods), the samples were analyzed by SDS-PAGE followed by staining with amido black (Fig. 1b) and silver stain (data not shown). Protein patterns and staining intensities were similar in most instances. The major protein bands as revealed by amido black were a weak 41 kDa band and an intense 32 kDa band.

### *Incubation of lyophilized mucus with live U. cyprinae*

Zymography was employed to compare the changes in protease banding patterns of oyster mucus incubated overnight with fed *U. cyprinae* (removed from the gills within one



hour of experimentation) and starved *U. cyprinae* (isolated from gills and cultured in sea water 6 weeks prior to experimentation). Reconstituted lyophilized mucus was used in initial studies. When comparing mucus exposed to fed worms (Fig. 2a, lane 2) with the control mucus solution (Fig. 2a, lane 1), no major differences were detected in their protease activity patterns, except for a minor band at 42 kDa in the mucus sample exposed to fed *U. cyprinae*. This band was also present in the sample containing the fed *U. cyprinae* only (Fig. 2a, lane 4). The banding patterns of the mucus sample exposed to fed *U. cyprinae* (Fig. 2a, lane 2) appear to result solely from the addition of the mucus proteases (Fig. 2a, lane 1) and the fed *U. cyprinae* proteases (Fig. 2a, lane 4). In contrast, major changes in protease banding patterns were observed in mucus exposed to starved *U. cyprinae* (Fig. 2a, lane 3) when compared to either mucus exposed to fed worms (Fig. 2a, lane 2) or the mucus control (Fig. 2a, lane 1) respectively. These changes are reflected by the appearances of two prominent bands detected at 61 kDa and 52 kDa, an increase in activity at 63 kDa, 54 kDa and 42 kDa and a decrease in protease activity at 73 kDa and 68 kDa (Fig. 2a, lane 3). No protease activity was detected in the sample containing isolated *U. cyprinae* (Fig. 2a, lane 5).

In order to examine the effect of *U. cyprinae* on the mucus protein profiles, treated mucus samples from the above experiment were analyzed using SDS-PAGE followed by silver staining. Similar protein patterns were observed for most mucus samples (Fig. 2b, lanes 1-3), corresponding to a major 36 kDa band (Fig. 2b). This band was prominent in the sample containing fed *U. cyprinae* only (Fig. 2b, lane 4). Moreover, a minor amount of protein was detected in the isolated *U. cyprinae* sample (Fig. 2b, lane 5), even though the worms had been removed from the gills and incubated in sea water six weeks prior to

experimentation. Comparable results were obtained using zymography and SDS-PAGE analyses of fresh oyster mucus instead of the lyophilized mucus solution (data not shown).

#### *Whole cell extracts*

Whole starved *U. cyprinae* and whole fed *U. cyprinae* were homogenized and their protease profiles were determined using zymography. A substantial difference in protease activity was observed between samples of whole starved *U. cyprinae* (Fig. 3, lane 1) compared to those of whole fed worms (Fig. 3, lane 2). Whole fed *U. cyprinae* were characterized by one major protease band at 64 kDa, a minor band at 25 kDa and a few faint bands between 50 and 30 kDa (Fig. 3, lane 2). In contrast, there were several protease bands present in whole starved *U. cyprinae*; most notable were two prominent bands at 61 and 57 kDa exhibiting high activity, followed by a series of faint bands detected at 85, 73, 68, 52, 45, 42 and 25 kDa.

#### *Characterization of oyster mucus proteases*

To characterize the class of proteases found in oyster gill mucus, the effects of various inhibitors on the protease activity of mucus was determined. As shown in Fig. 4, zymography detected two distinct protease bands at 96 and 64 kDa respectively, similar to those obtained from the experiment using infected and non-infected mucus (Fig. 1a) as well as an additional faint band at 33 kDa. The activity of the 64 kDa protease band was neither suppressed by aprotinin nor by iodoacetamide, inhibitors of serine and thiol proteinases respectively (Fig. 4). In contrast, EDTA, and *o*-phenanthroline, a zinc ( $Zn^{2+}$ ) chelator, completely blocked the activity of the 64 kDa band (Fig. 4, lanes 3-4). None of the

inhibitors tested had any effect on the activity of the 96 kDa band (Fig. 4). The faint 33 kDa protease band was inhibited by aprotinin but not by the other inhibitors.

## DISCUSSIONS

The importance of mucus in activities associated with bivalve-suspension feeding is well-documented (Ward *et al.* 1994, Ward 1996). Mucus also serves as the first line of defense against invading pathogenic organisms and would be expected to contain protective activities. In many marine organisms, a number of protective activities have been identified in the mucus, including proteases (Hjelmeland *et al.* 1983, Braun *et al.* 1990, Canicatti *et al.* 1992, Aranishi *et al.* 1998), enzymes that catalyse the hydrolysis of peptide bonds (McKerrow 1989). Based on their activity, proteases are divided into four classes: serine, cysteine, aspartic and metallo- proteases. In the present study, we have shown that oyster gill mucus contains two major proteases, one at 96 kDa, the other at 64 kDa and a minor protease of 33 kDa. The activity of the 64 kDa protease was completely suppressed by the metalloprotease inhibitors, EDTA and *o*-phenanthroline, but not by the inhibitors of the other classes of proteases. These characteristics indicate that the 64 kDa mucus protease may be classified as a zinc metalloprotease requiring  $\text{Ca}^{2+}$  for activity. In vertebrates, metalloproteinases are typically associated with immune response and tissue repair (Woessner 1991). For example, neutrophils and fibroblasts secrete gelatinase, a metalloproteinase that has been implicated in leukocyte migration to sites of infection. A metalloproteinase has also been observed in the mucus of Atlantic salmon *Salmo salar* (Firth and Ross, unpublished observation). The activity of the 96 kDa protease was not blocked by the inhibitors of serine, thiol nor metallo- proteases and is speculated to be an acid protease. However, further studies are required to determine its mode of action. The 33 kDa protease was inhibited by aprotinin only, suggesting that it is a serine protease.

Serine proteases are often associated with digestion (Halfon and Craik 1998) and immune function (Bieth 1998, Salvesen 1998).

Both the 96 kDa protease and the 64 kDa metalloproteases were present in mucus samples from non-infected oysters. In contrast, the 96 kDa mucus protease was absent in most of the oysters infected with *U. cyprinae*, suggesting that the presence of the worms have altered the composition of the gill mucus. *In vitro* experiments confirmed that the composition of oyster mucus proteases were altered when incubated with *U. cyprinae*. Interestingly, the nutritional status of the *U. cyprinae* was a factor in the processing of oyster mucus proteases, with starved *U. cyprinae* causing significant changes to the degradation of oyster mucus proteases whereas mucus exposed to fed worms exhibited much less degradation.

Oyster gills have been found to have agglutinating activity, suggested to be affiliated with the mucus cells of these organs (Fisher 1992). It is hypothesized that the presence of agglutinins in mucus could play a significant role in the external defense of the oyster (Fisher 1992). A protein of 36 kDa observed in the oyster mucus was also found in the incubation mixtures of the fed and starved *U. cyprinae* only samples, even though the starved worms were cultured in sea water six weeks prior to the beginning of the experiments. This band appears to be an oyster-derived protein, because of its presence in mucus from uninfected oysters. Its appearance in *U. cyprinae* six weeks after being removed from oysters suggests that this protein is stable and may bind tightly to invading organisms, implying a possible defensive role.

The current study demonstrates the active release of proteases by both *U. cyprinae* and oyster gill mucus. As previously mentioned, proteases play important roles in the

pathogenicity of parasitic organisms (McKerrow 1989, Garreis *et al.* 1996, Beresain *et al.* 1997), and also in the defense mechanisms of the host (Hjelmeland *et al.* 1983, Alexander and Ingram 1992). It is possible that *U. cyprinae* secretes proteases to facilitate and degrade oyster mucus for nutrient provision. This hypothesis is supported by the observation that starved *U. cyprinae* show significantly more proteolytic activity when exposed to oyster mucus than fed worms. *U. cyprinae* is also known to induce pathological reactions in gill tissue of mussels (Robledo *et al.* 1994). The host-gill pathology associated with *U. cyprinae* infection may result from direct damage to the host tissue by secreted proteases or degradation of mucus molecules that protect the gill tissue from osmotic shock or other damaging agents, such as bacteria. Alternatively, the worm may utilize these proteases as a protective mechanism against host immune responses, as is the case for other helminths (Beresain, *et al.* 1997, Perkins *et al.* 1997).

At present, the functions of the proteases released by both *U. cyprinae* and oyster mucus remain speculative. Ongoing studies are being conducted to further characterize their role in the biology of the parasite and host-parasite interactions between oysters and *U. cyprinae*.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our gratitude to Vanya Ewart (National Research Council Canada, Institute for Marine Biosciences, Halifax, NS, Canada), William S. Fisher (US Environmental Protection Agency, Gulf Breeze Environmental Research Laboratory, Sabine Island, Florida, USA, 32561-5299), Marc Charland (Département de Biologie, Université de Moncton, NB, Canada) and Kara Firth (National Research Council Canada, Institute for Marine Biosciences, Halifax, NS, Canada) for their valuable comments and suggestions. The authors would also like to thank Léo Blanchard (Département d'audio-visuel, Université de Moncton, NB, Canada) for his technical assistance with the editing of the figures. Financial support to the senior author was provided by the Faculty of Research and Graduate Studies of the Université de Moncton. This project is part of the Richibucto Environment and Resource Enhancement Project. NRCC Publication No. xxxxxx.

## REFERENCES

- Alexander, J.B., and Ingram, G.A. 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 249-279.
- Aranishi, F., Mano, N., Nakane, M., and Hirose, H. 1998. Epidermal response of the Japanese eel to environmental stress. *Fish. Physiol. Biochem.* **19**, 197-203.
- Avila, E.E., and Calderon, J. 1993. *Entamoeba histolytica* trophozoites : a surface-associated cysteine protease. *J. Exp. Parasitol.* **76**(3), 232-241.
- Beith, J.G. 1998. Leukocyte Elastase. In "Handbook of Proteolytic Enzymes" (A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner, Eds.), pp. 54-60. Academic Press, London.
- Beresain, P., Goñi, F., McGonigle, S., Dowd, A., Dalton, J.P., Frangione, B., and Carmona, C. 1997. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J. Parasitol.* **83**(1), 1-5.
- Boghen, A.D., Allard, J., et Bataller, E. 1993. Rapport final et recommandations sur le programme de Monitoring pour la côte est du Nouveau-Brunswick. Centre de recherche en sciences de l'environnement, Université de Moncton, Moncton, Nouveau-Brunswick, 76 pp.



Bower, S. M., McGladdery, S. E., and Price, I. M. 1994. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*. **4**, 1-199.

Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye-Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Braun, R., Arnesen, J.A., Rinne, A., and Hjelmeland, K. 1990. Immunohistological localization of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Diseases*. **13**, 233-238.

Brun, N.T., Boghen, A.D., and Allard, J. 1999a. Attraction of *Urastoma cyprinae* Graff, 1882 (Turbellaria : Urastomidae) to the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.* (In Press)

Brun, N.T., Boghen, A.D., and Allard, J. 1999b. Distribution of the turbellarian *Urastoma cyprinae* on the gills of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *J. Shell. Res.* (In Press)

Burt, M.D.B., and Drinnan, R.E. 1968. A microturbellarian found in oysters off the coast of Prince Edward Island. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **25** (11), 2521-2522.

Canicatti, C., Ville, P., Pagliara, P., and Roch, P. 1992. Hemolysins from the mucus of *Spirographis spallanzani* (Polychaeta : Sabellidae). *Mar. Biol.* **114**, 453-458.

Cornick, J.W., and Stewart, J.E. 1968. Interaction of the Pathogen *Gaffkya homari* with Natural Defense Mechanisms of *Homarus americanus*. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **25**(4), 695-709.

Ellis, A.E. 1981. Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes. *Dev. Biol. Stand.* **49**, 337-352.

Ellis, A.E., Masson, N., and Munro, A.L.S. 1990. A comparison of proteases extracted from *Caligus elongatus* (Nordmann, 1832) and *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer, 1838). *J. Fish. Diseases.* **13**, 163-165.

Fisher, W.S. 1992. Occurrence of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **162**, 1-13.

Fisher, W.S., and DiNuzzo, A.R. 1991. Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* **57**, 380-394.

Fleming, L.C., Burt, M.D.B., and Bacon, G.B. 1981. On some commensal Turbellaria of the Canadian East Coast. *Hydrobiologia* **84**, 131-137.

- Fleming, L.C. 1986. Occurrence of symbiotic turbellarians in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Hydrobiologia*. **132**, 311-315.
- Garreis, K.A., La Peyre, J.F., and Faisal, M. 1996. The effects of *Perkinsus marinus* extracellular products and purified proteases on oyster defence parameters *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology*. **6**, 581-597.
- Halfon, S., and Craik, C.S. 1998. Trypsin. In "Handbook of Proteolytic Enzymes" (A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner, Eds.), pp. 12-21. Academic Press, London.
- Hassel, M., Klenk, G., and Frohme, M. 1996. Prevention of Unwanted Proteolysis during Extraction of Proteins from Protease-Rich Tissue. *Anal. Biochem.* **242**, 274-275.
- Hjelmeland, K., Christie, M., and Raa, J. 1983. Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *J. Fish. Biol.* **23**, 13-22.
- Ingram, G.A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection – A review. *J. Fish. Biol.* **16**, 23-60.
- Kamata, I., Yamada, M., Uchikawa, R., Matsuda, S., and Arizono, N. 1995. Cysteine protease of the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* preferentially evokes an IgE/IgG1 antibody response in rats. *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 71-77.

Knox, D.P., and Jones, D.G. 1990. Studies on the presence and release of proteolytic enzymes (Proteinases) in gastro-intestinal nematodes of ruminants. *Int. J. Parasitol.* **20**, 243-249.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.

McGladdery, S.E., Bogen, A.D., and Allard, J. 1992. *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) in Eastern Oyster *Crassostrea virginica* – Population dynamics and effects. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada.* **92**, 17-19.

McGladdery, S.E., Drinnan, R.E., and Stephenson, M.F. 1993. A manual of parasites, pests and diseases of Canadian Atlantic bivalves. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1931, 121pp.

McKerrow, J.H. 1987. Parasite Proteases. *Exp. Parasitol.* **68**, 111-115.

McKerrow, J.H. 1989. Workshop summary : The role of proteases in the pathogenesis and immune response to parasitic disease. In "Molecular Strategies of Parasitic Invasion" (N. Agabian, H. Goodman, N. Nogueira, Eds.), pp. 553-557. Alan R. Liss Inc., New York .

Perkins, P.S., Haley, D., and Rosenblatt, R. 1997. Proteolytic enzymes in the blood-feeding parasitic copepod, *PhrEXOcephalus cincinnatus*. *J. Parasitol.* **83**(1), 6-12.

Plourde, S. 1991. Incidence du turbellarié *Urastoma cyprinae* chez l'huître native, *Crassostrea virginica*. Thèse d'Initiation à la Recherche , Université de Moncton, Moncton, NB, Canada, 49pp.

Robledo, J.A.F., Càceres-Martinez, J., Sluys, R., and Figueras, A. 1994. The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes : Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain : occurrence and pathology. *Dis. aquat. Org.* **18**,2 03-210.

Salvesen, G.S. 1998. Cathepsin G. In "Handbook of Proteolytic Enzymes" (A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner, Eds.), pp 60-62. Academic Press, London.

Sung, K.C., and Dresden, M.H. 1986. Cysteinyln proteinases of *Shistosoma mansoni* eggs : purification and partial characterization. *J. Parasitol.* **72**(6), 891-900.

Swain, M., and Ross, N.W. 1995. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* **16**, 948-951.

Ward, J.E. 1996. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs : particle capture, processing, and fate. *J. Invertebr. Biol.* **115**(3), 218-231.

Ward, J.E., Newell, R.I.E., Thompson, R.J., and MacDonald, B.A. 1994. *In Vivo* Studies of Suspension-Feeding Processes in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol. Bull.* **186**, 221-240.

White, C. A. Jr., Baig, S., and Robinson, P. 1996. *Taenia saginata* oncosphere excretory/secretory peptidases. *J. Parasitol.* **82**(1), 7-10.

Woessner J.F., Jr. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASB J.* **5**, 2145-2154.

## Figure legends

Figure 1a. Protease activity of mucus samples collected from six non-infected (lanes 1- 6) and six infected (lanes 7-12) oysters as detected with zymography. Molecular weight standards in (kDa) are listed from top to bottom and indicated by the tick marks on the left of the gel (106.0; 80.0; 49.5; 32.5; 27.5; 18.5). [ ◀ ] 96 kDa band, [ ◁ ] 64 kDa band.

Figure 1b. Protein analysis of mucus samples taken from non-infected (lanes 1-6) and infected (lanes 7-12) oysters using SDS-PAGE followed by staining with amido black. Tick marks on side of gel correspond to the molecular weights of the standards identical to those in Fig. 1a.

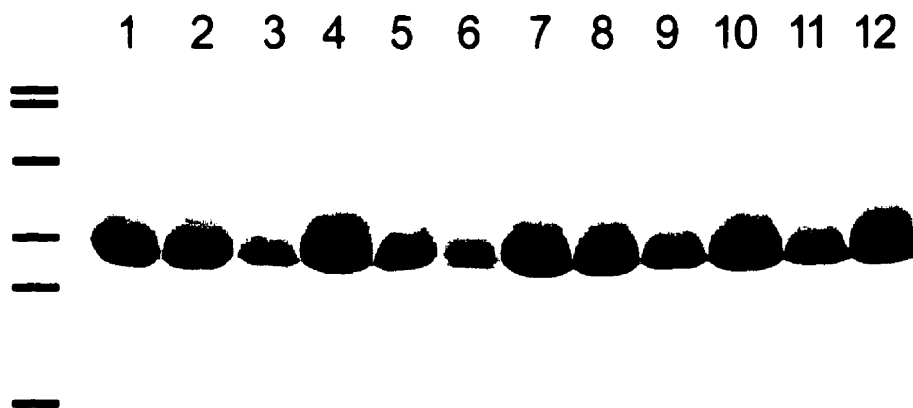
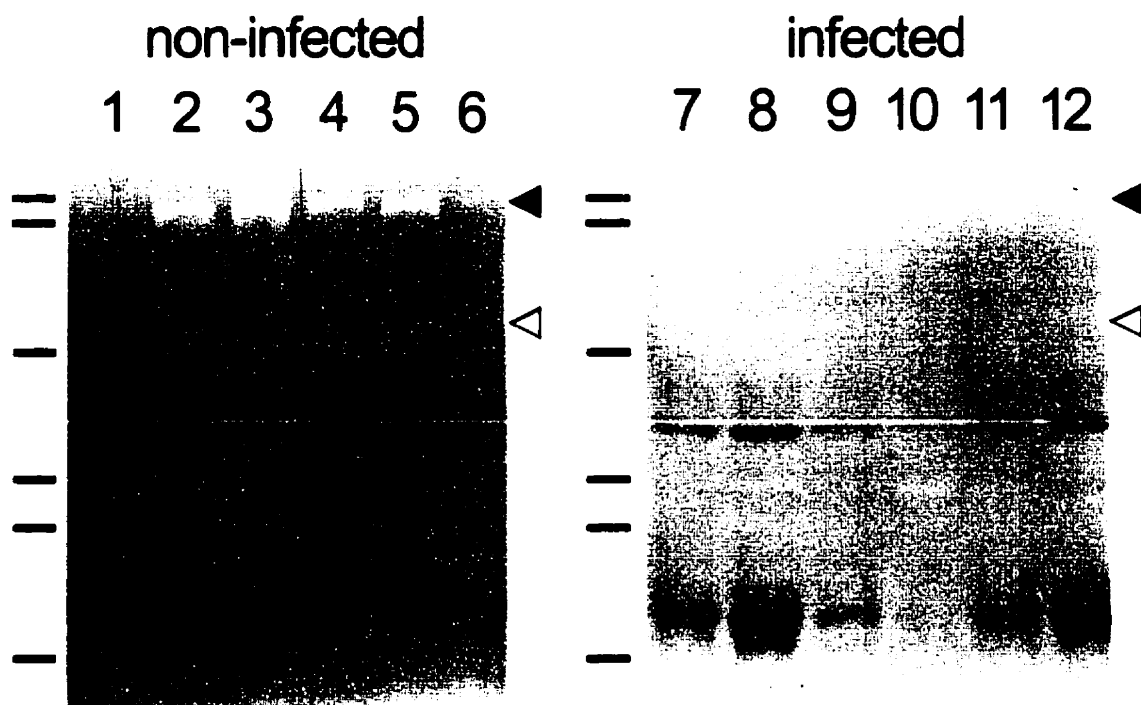
Figure 2a. Protease activity of mucus samples (rehydrated lyophilized mucus) exposed to starved or fed *U. cyprinae* using zymography. The molecular weight standards (kDa) used are the following: 202.0; 109.0; 78.0; 46.7; 34.5; 28.8; 20.5. Lane 1, mucus in sea water only; lane 2, mucus exposed to fed *U. cyprinae*; lane 3, mucus exposed to starved *U. cyprinae*; lane 4, fed *U. cyprinae* in sea water only; lane 5, starved *U. cyprinae* in sea water only. [ ← ] 42 kDa band, [ ■ ] appearance of protease activity (61 kDa, 52 kDa), [ ● ] increase in protease activity (63 kDa, 54 kDa, 42 kDa), [ \* ] decrease in protease activity (73 kDa, 68 kDa).

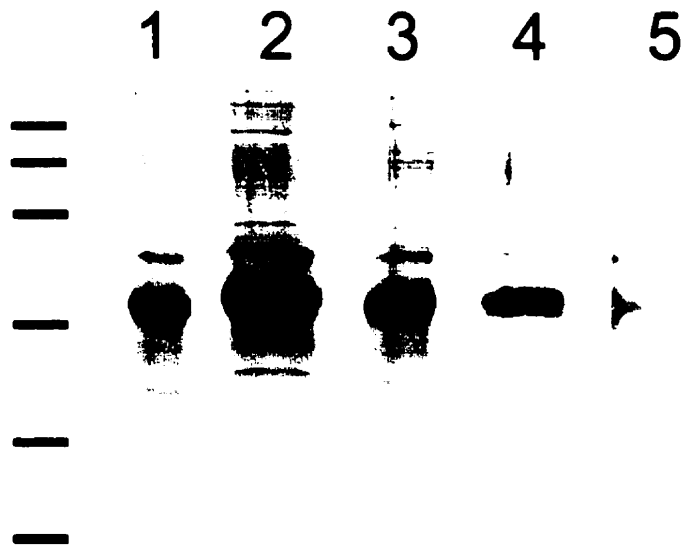
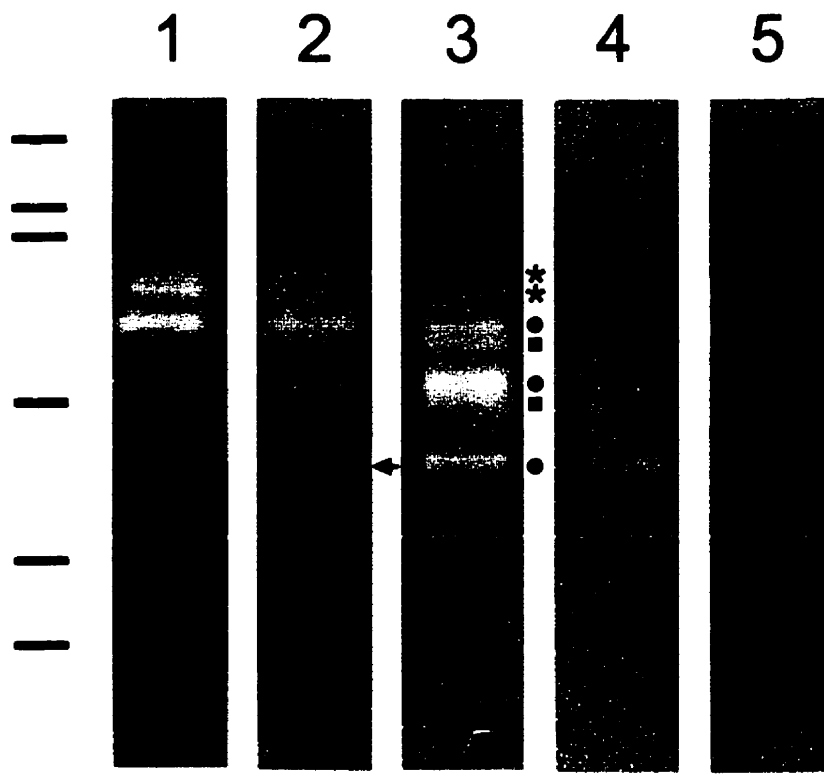
Figure 2b. Protein patterns of samples from Fig. 2a using SDS-PAGE followed by silver staining. Tick marks on the left of the gel correspond to the following molecular weight markers in (kDa): 97.4; 66.2; 45.0; 31.0; 21.5; 14.4.

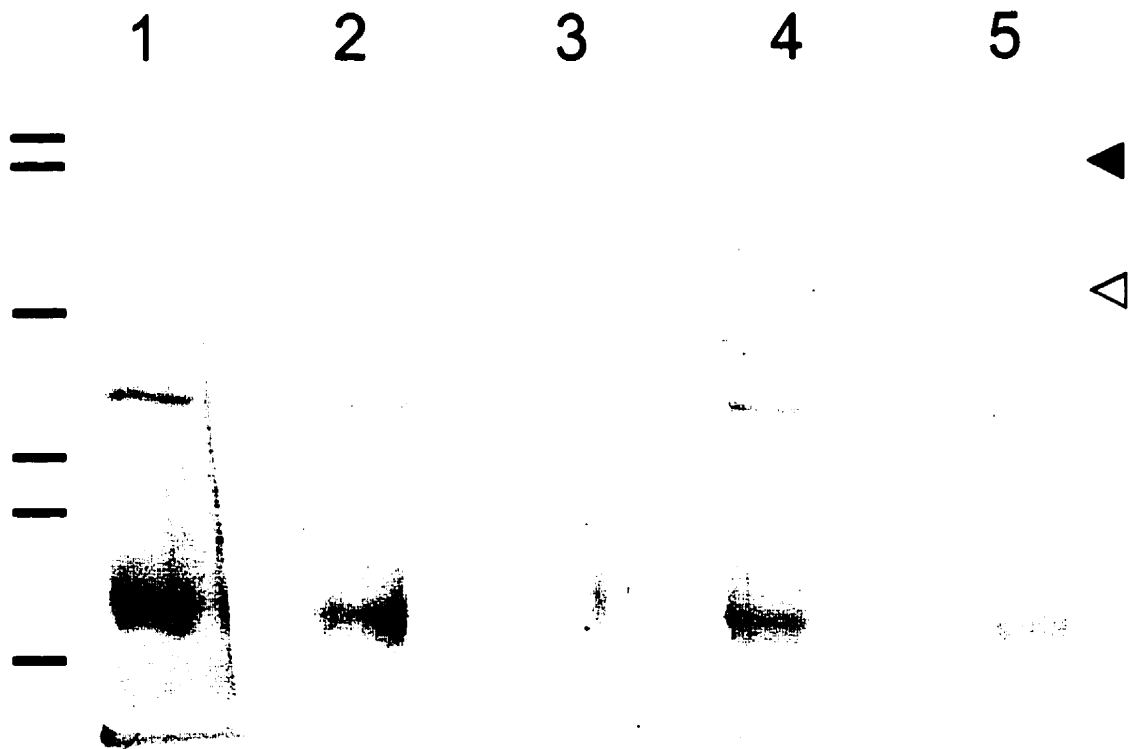
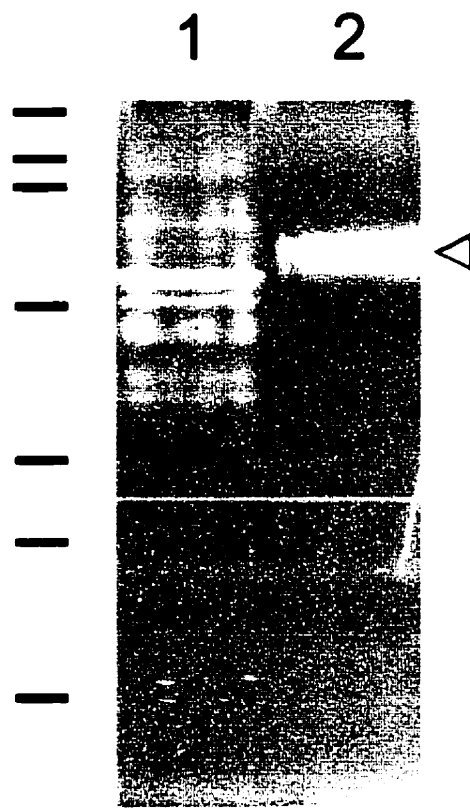
Figure 3. Protease activity of whole starved *U. cyprinae* (lane 1) and whole fed *U. cyprinae* (lane 2) as detected by zymography. [◁] 64 kDa band. Molecular weight standards are similar to those given in Fig. 1a.

Figure 4. Effect of proteinase inhibitors on the activity of fresh oyster mucus as detected on gelatin-containing SDS-PAGE gels (zymograms). Tick marks on the side of the gel correspond to the molecular weight standards and correspond to those in Fig. 1a. Lane 1, mucus control; lane 2, aprotinin (40 µg/ml); lane 3, EDTA (10 mM); lane 4, *o*-phenantroline (5 mM); lane 5, iodoacetamide (5 mM), [◀] 96 kDa band, [◁] 64 kDa band.









## DISCUSSION GÉNÉRALE

Depuis la dernière décennie, l'industrie ostréicole des provinces de l'Atlantique a connue une augmentation au niveau de la production et démontre un potentiel économique prometteur pour le pays. En plus de sa valeur économique, l'huître *Crassostrea virginica* est également considérée comme une espèce importante au point de vue écologique (Dame *et al.* 1984, Newell 1988).

La croissance et la survie de cette espèce sont grandement influencées par divers facteurs, tels que la température, la salinité, l'oxygène dissous et la matière en suspension dans la colonne d'eau. De plus, il ne faut pas exclure la présence de maladies et/ou de parasites et leur impact sur l'état de santé des huîtres. Bien que, jusqu'à présent, le Canada atlantique a été épargné par des organismes pathogènes, à l'exception de la Maladie de Malpèque (McGladdery *et al.* 1993), les huîtres de nos régions pourraient devenir susceptibles à certains problèmes.

À cet effet, au cours d'un programme de monitoring (Boghen *et al.* 1993), l'organisme le plus souvent observé parmi les macroorganismes identifiés chez les huîtres échantillonnées était le turbellarié *Urastoma cyprinae*. Des études subséquentes ont démontré que le niveau d'infestation par *U. cyprinae* chez l'huître pouvait être important ( plus que 1000 par huître, Drinnan, comm. pers.), et que celui-ci était inversement corrélé à la quantité de glycogène et l'indice physiologique de ces bivalves (Plourde 1991, McGladdery *et al.* 1992). Plus récemment, Robledo *et al.* (1994) ont indiqué que *U. cyprinae* était capable d'induire des réactions pathologiques au niveau des branchies de son hôte, la moule *Mytilus galloprovincialis*, et pourrait réduire leur capacité de

filtration. Ces constatations suggèrent que *U. cyprinae* est plus qu'un simple commensal, tel que proposé par certains auteurs (Burt and Drinnan 1968).

Nos connaissances sur la biologie de *U. cyprinae* demeurent limitées à quelques brèves études portant sur la description de certaines structures (yeux, tégument, organes reproducteurs) et des différentes étapes dans le développement du ver (Burt and Phillips 1969, Burt and Fleming 1978, Burt and Bance 1981, Fleming *et al.* 1981, Fleming 1986, Tyler and Burt 1988, Noury-Sraïri *et al.* 1989a, 1989b, 1990, Rohde *et al.* 1990). De plus, aucune recherche n'a été réalisée afin de mieux comprendre la nature de la relation qui existe entre *U. cyprinae* et son hôte. En d'autres mots, les activités de *U. cyprinae*, lorsque dans son hôte, ainsi que leur influence sur l'huître sont jugés importants et méritent donc une attention particulière. Ces lacunes dans nos connaissances de base sur la biologie de *U. cyprinae* ont mené à la réalisation d'une série d'études portant sur *U. cyprinae* et sa relation avec l'huître *Crassostrea virginica*.

Une première étude a été effectuée afin de déterminer les sources d'attraction possibles de *U. cyprinae* envers son hôte (Chapitre 1). Les résultats ont démontré que le ver était attiré aux huîtres, ce qui met en évidence que la présence de *U. cyprinae* chez l'huître n'est pas attribuable au hasard. De plus, le ver a démontré une forte attraction envers le mucus sécrété par les branchies de l'huître, ce qui est conforme aux observations avancées de Fleming (1986). Cet auteur a remarqué que des huîtres 'propres' sans trop de mucus sur les branchies ne contenaient pas de *U. cyprinae*. Selon Fleming (1986), *U. cyprinae* se nourrit du mucus produit par l'huître et quitte celle-ci lorsque le mucus n'est plus disponible.

Le rôle du mucus dans le traitement des particules chez les bivalves suspensivores a été établi par des techniques de microscopie à laser confocal, de cartographie des mucocytes et, plus récemment, par des techniques de vidéo-endoscopie (Ward *et al.* 1993, Beninger and Dufour 1996, Beninger *et al.* 1997b). D'autant plus, il a été démontré que les propriétés visco-élastiques et chimiques des mucopolysaccharides qui composent le mucus varient selon la région branchiale. Par exemple, le mucus contenu dans le sillon dorsal est moins visqueux que celui du sillon ventral des branchies. Ceci dit, sachant que *U. cyprinae* démontre une forte attraction envers le mucus branchial de l'huître (d'après les résultats du Chapitre 1), et que le ver se nourrit possiblement de cette substance (Fleming 1986), la distribution de *U. cyprinae* sur les zones dorsales, médianes et ventrales a été examinée en tenant compte des caractéristiques du mucus associées avec ces régions (Chapitre 2).

*U. cyprinae* a été retrouvé en plus grand nombre dans les zones dorsales des branchies où se situe le sillon dorsal, comparé aux régions médianes et ventrales. Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer ces résultats. Comme déjà mentionné, le mucus du sillon dorsal est peu visqueux et peut être visible comme un flux de mucus, tandis qu'on observe un cordon de mucus très visqueux dans le sillon ventral (Ward *et al.* 1993, 1994). Il est suggéré que les zones dorsales s'avèrent donc plus accessibles pour les activités de *U. cyprinae*. De plus, si l'on considère que le ver ne se nourrit pas uniquement du mucus mais aussi des particules retenues dans le mucus, la préférence de *U. cyprinae* pour les régions dorsales, où le cordon alimentaire de l'huître se met en place, peut être attendue.

Le tégument de *U. cyprinae* est formé d'un épithélium cilié mince (Schmidt and Roberts 1989, Noury-Sraïri *et al.* 1990), c'est-à-dire d'une couche vivante et dynamique, contrairement à la cuticule, qui est une couche sécrétée non-vivante chez les Nématodes (Schmidt and Roberts 1989). Il a été démontré que le tégument de *U. cyprinae* joue un rôle dans l'absorption des nutriments dans le milieu extérieur (Noury-Sraïri *et al.* 1990). Si l'on considère que *U. cyprinae* ne se nourrit pas seulement avec son pore oral-génital situé dans la partie postérieure, mais que le tégument aussi agit dans l'acquisition et le transfert des particules, les régions dorsales représentent des sites idéaux permettant un contact intime entre le corps de *U. cyprinae* et le flux du mucus. Des expériences parallèles en microscopie électronique sont en cours afin d'examiner l'interphase hôte-parasite entre le tégument de *U. cyprinae* et les filaments branchiaux de l'huître. De telles études pourraient fournir des informations sur les mécanismes et les types d'échanges pouvant s'effectuer à ce niveau, et contribuer à la compréhension de la nature de la relation entre ces deux organismes.

Afin d'obtenir une meilleure appréciation des interactions possibles entre *U. cyprinae* et le mucus contenu dans la zone dorsale des branchies, des observations directes du ver chez l'huître ont été faites en utilisant des techniques de vidéo-endoscopie (voir Annexe). Cette méthode m'a permis d'obtenir une image vraie (en trois dimensions) de *U. cyprinae*, ainsi qu'une interprétation plus précise de l'apparence et des mouvements corporels de l'organisme, contrairement à des études de microscopie optique, où les observations de *U. cyprinae* étaient limitées à une vue sur seulement deux dimensions.

*U. cyprinae* était attaché aux filaments branchiaux par le bout antérieur où se trouve les yeux, laissant la partie postérieure de son corps libre (Annexe, Fig. 1a). Des études

sont présentement en cours afin de décrire et de situer le système glandulaire servant à l'attachement de *U. cyprinae* au tissu branchial. Bien qu'un contact entre le pore oral-génital de *U. cyprinae* a été observé, un contact plus extensif a été noté entre le corps du ver et le flux du mucus dans le sillon dorsal. De plus, *U. cyprinae* a démontré des mouvements corporels spécifiques, tels que l'arquage du corps (Annexe, Fig. 1b-1d), le sondage et le repositionnement sur les filaments. Ces types de comportements semblent maximiser le contact entre le corps du ver et le mucus du sillon dorsal de l'huître. D'ailleurs, ces observations sont conformes à ceux de Hooge and Tyler (soumis), qui ont décrit l'arrangement musculaire du corps de *U. cyprinae* selon les différents types de muscles et leur emplacement chez le ver. Considérant le type, l'orientation et le développement des muscles du corps de *U. cyprinae*, tels que décrits par ces auteurs, on est capable d'associer l'arrangement musculaire du corps du ver avec les comportements observés par l'endoscopie.

Selon les résultats d'études antérieures, il a été démontré que les parasites sécrètent des enzymes ayant des fonctions importantes qui aident dans la pénétration et la digestion du tissu de leur hôte (Sung and Dresden 1986, Berasain *et al.* 1997). D'un autre côté, le mucus de l'hôte contient entre autres, des protéases qui participent dans les activités de défense de l'organisme (Hjelmeland *et al.* 1983, Braun *et al.* 1990). Puisque les branchies de l'huître servent à l'attachement de *U. cyprinae* et, plus spécifiquement, que le mucus branchial semble jouer un rôle dans l'alimentation du ver, il est donc raisonnable de soupçonner que certains des interactions entre *U. cyprinae* et l'huître ont lieu dans le mucus sécrété par les branchies.



Des études biochimiques ont été menées afin de déterminer si la présence de *U. cyprinae* pourrait affecter les profils électrophorétiques du mucus branchial en se servant de protéases comme indicateurs. Les résultats de ces expériences ont clairement démontré que la présence du ver affecte les protéases du mucus branchial. Pour l'instant, les rôles de ces enzymes dans les interactions entre *U. cyprinae* et l'huître restent encore à être déterminés. Cependant, il est suggéré que ces protéases jouent possiblement un rôle dans l'alimentation de *U. cyprinae*.

En conclusion, les résultats de ces expériences suggèrent fortement que *U. cyprinae* se nourrit du mucus sécrété par les branchies de l'huître. Cet ouvrage apporte des informations supplémentaires à nos connaissances de base actuelles sur la biologie du ver et sur les interactions entre *U. cyprinae* et l'huître. Cependant, de plus amples recherches doivent être effectuées afin de préciser le rôle du mucus dans les activités de *U. cyprinae*. Entre autres, une étude combinant les techniques endoscopiques et biochimiques permettrait d'isoler et de comparer les protéases du mucus retrouvé spécifiquement dans les régions branchiales, où se trouve *U. cyprinae*, avec ceux provenant de mucus témoin. Il serait aussi intéressant de comparer le nombre et la distribution des vers sur les branchies d'huîtres stressées et non-stressées et de quantifier le mucus présent sur les branchies de ces deux groupes. Une dernière étude qui pourrait être effectuée consiste à comparer les comportements de *U. cyprinae* sur les branchies, surtout dans les régions dorsales, chez des huîtres témoins et assujetties à des conditions stressantes, c'est-à-dire en modifiant certains facteurs externes comme la température, la salinité, la quantité de matière en suspension dans l'eau et la disponibilité de la nourriture.

## 1. Références

- Beninger PG and Dufour SC (1996) Mucocyte distribution and relationship to particle transport on the pseudolamellibranch gill of *Crassostrea virginica* (Bivalvia : Ostreidae). *Mar Ecol Prog Ser* 137:133-138
- Beninger PG, Dufour SC and Bourque J (1997a) Particle processing mechanisms of the eulamellibranch bivalves *Spisula solidissima* and *Mya arenaria*. *Mar Ecol Prog Ser* 150:157-169
- Beresain P, Goñi F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B and Carmona C (1997) Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol* 83(1):1-5
- Boghen AD, Allard J et Bataller E (1993) Rapport final et recommandations sur le programme de monitoring pour la côte est du Nouveau-Brunswick, Centre de recherche en sciences de l'environnement, Université de Moncton, Moncton, Nouveau-Brunswick, 76 pp
- Braun R, Arnesen JA, Rinne A and Hjelmeland K (1990) Immunohistological localization of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Diseases* 13:233-238
- Burt MDB and Bance GN (1981) Ultrastructure of the eye of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria, Alloeocoela). *Hydrobiologia* 84:276
- Burt MDB and Drinnan RE (1968) A microturbellarian found in oysters off the east coast of Prince Edward Island. *J Fish Res Bd Can* 25(11):2521-2522
- Burt MDB and Fleming LC (1978) Phylogenetic clues in the ultrastructure of Turbellaria and Cestoda teguments. *Parasitology* 77:xxx-xxxi
- Burt MDB and Phillips WL (1969) The fine structure of *Urastoma cyprinae*, a microturbellarian found in oysters. *Am Zoologist* 9:622
- Dame RF, Zingmark RG and Haskin E (1984) Oyster reefs as processors of estuarine materials. *J Exp Mar Biol Ecol* 83:239-247
- Fisher WS (1992) Occurrence of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters. *J Exp Mar Biol Ecol* 162:1-13
- Fleming LC (1986) Occurrence of symbiotic turbellarians in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Hydrobiologia* 132:311-315
- Fleming LC, Burt MDB and Bacon GB (1981) On some commensal Turbellaria of the Canadian East Coast. *Hydrobiologia* 84:131-137

- Hjelmeland K, Christie M and Raa J (1983) Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *J Fish Biol* 23:13-22
- Hooge MD and Tyler S (in Review) Musculature of the facultative parasite *Urastoma cyprinae*. *J Morphol*
- McGladdery SE, Boghen AD and Allard J (1992) *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) in Eastern Oyster *Crassostrea virginica* – Population Dynamics and Effects. *Bull Aquacul Assoc Canada* 92-3:17-19
- McGladdery SE, Stephenson MF and Drinnan RE (1993) A manual of parasites, pests and diseases of Canadian Atlantic bivalves. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci*, 1931, 121 pp
- Newell RIE (1988) Ecological changes in Chesapeake Bay : Are they the result of over harvesting the American oyster (*Crassostrea virginica*)? Pp. 536-546, in *Understanding the Estuary : Advances in Chesapeake Bay Research*. M. Lynch (ed.). Chesapeake Consortium Publication 129, Virginia
- Noury-Sraïri N, Justine J.-L et Euzet L (1989a) Implications phylogénétiques de l'ultrastructure de la spermiogénèse, du spermatozoïde et de l'ovogénèse du Turbellarié *Urastoma cyprinae* ('Prolecithophora', Urastomidae). *Zool Scr* 18:175-185
- Noury-Sraïri N, Justine J.-L et Euzet L (1989b) Ultrastructure of granules in the seminal vesicles of the parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* ('Prolecithophora', Urastomidae). *Parasit Res* 76:176-177
- Noury-Sraïri N, Justine J.-L et Euzet L (1990) Ultrastructure du tégument et des glandes sous-épithéliales de *Urastoma cyprinae* (Prolecithophora), turbellarié parasite de mollusque. *Annales des Sciences Natuelles, Zoologie* 13<sup>e</sup> série 11:53-71
- Plourde SM (1991) Thèse d'initiation à la recherche. Université de Moncton, Moncton, NB, 49 pp
- Robledo JAF, Cacerès-Martinez J, Sluys R et Figueras A (1994) The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes : Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain : occurrence and pathology. *Dis Aquat Org* 18:203-210
- Rohde K, Noury-Sraïri N, Watson N, Justine J.-L and Euzet L (1990) Ultrastructure of the Flame Bulbs of *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes, 'Prolecithophora', Urastomidae). *Acta zool, Stockh* 71:211-216
- Schmidt GD and Roberts LS (1989) *Foundations of Parasitology*. Time Mirror/Mosby College Publishing. St. Louis, Missouri, 750 pp

Sung KC and Dresden MH (1986) Cysteinyl proteinases of *Shistosoma mansoni* eggs : purification and partial characterization. *J. Parasitol* 72(6):891-900

Tyler S and Burt MDB (1988) Lensing by a Mitochondrial Derivate in the Eye of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria, Prolecithophora). *Fortschritt der Zoologie/Progress in Zoology* 36:229-234

Ward JE, MacDonald BA, Thompson RJ and Beninger PG (1993) Mechanisms of suspension-feeding in bivalves : resolution of current controversies by means of endoscopy. *Limnol Oceanogr* 38:265-272

Ward JE, Newell RIE, Thompson RJ, MacDonald BA (01994) *In vivo* studies of suspension-feeding processes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol Bull* 186:221-240

## **ANNEXE**

### **1. Observations endoscopiques**

Afin d'acquérir des connaissances de base sur le comportement de *Urastoma cyprinae* chez l'huître, des observations directes de *U. cyprinae* sur les branchies de *Crassostrea virginica* ont été effectuées en utilisant des techniques de vidéo-endoscopie (Ward *et al.* 1991, Ward 1996, Ward *et al.* 1998).

Douze huîtres adultes infectées avec *U. cyprinae* ont été recueillies à marée basse dans la baie de Shippagan (N.-B., Canada) en août 1996. Les animaux ont été transportés à l'Université de Moncton sur glace et examinés dans les 48 heures suivant la collecte.

L'endoscope utilisé était composé d'un tube d'insertion optique de 1,7 mm dans lequel se situait des fibres optiques. La source lumineuse se rendait, via les fibres optiques, jusqu'à l'extrémité distale du tube d'insertion. L'endoscope était relié à une vidéo-caméra par un adaptateur à montage C. La caméra était branchée à un magnétoscope Hi-8, qui était relié à un moniteur vidéo. Un macromanipulateur a été branché entre l'endoscope et la caméra sur un statif ajustable selon trois axes, ce qui permettait un mouvement fin et précis de l'endoscope.

Chaque huître a été examinée individuellement en la plaçant sur un support à angle ajustable dans un seau de 30 l rempli d'eau de mer filtrée (25 ppt, 22 °C). Des coins de bois ont été insérés entre les valves de l'huître afin de prévenir la fermeture des coquilles, qui aurait comme conséquence l'endommagement de l'endoscope. Les animaux n'étaient pas nourris pendant l'expérimentation.

Le tube d'insertion optique a été introduit dans la cavité palléale de l'huître, entre les filaments branchiaux et laissé tel quel pendant une à deux heures pour que l'animal puisse

s'habituer à la présence de l'instrument. Les enregistrements des comportements d'*U. cyprinae* sur les branchies ont été réalisés pour chacune des douze huîtres. Certaines séquences sur vidéo Hi-8 ont été sélectionnées, éditées et transférées sur cassette VHS, et des images d'*U. cyprinae* sur les filaments branchiaux ont été captées et photographiées.

Bien que les observations endoscopiques ont démontré que les vers étaient distribués sur toute la surface branchiale, ils ont été retrouvés en plus grand nombre le long du sillon dorsal, c'est-à-dire dans les régions dorsales des branchies (Fig. 1a). Généralement, *U. cyprinae* était attaché aux filaments branchiaux à partir de leur extrémité antérieure où se situent les yeux. Pourtant, la partie postérieure de son corps, où se trouve le pore oral-génital, était le plus souvent 'libre' (Fig. 1a).

Bien qu'un contact entre le pore oral-génital de *U. cyprinae* et le mucus de la région dorsale a été observé quelques fois, le plus souvent, on a pu noter un contact plus intime entre le corps du ver et le flux de mucus dans le sillon dorsal. De plus, *U. cyprinae* a démontré des comportements spécifiques tels que l'arquage du corps (Fig. 1b-1d), le sondage et la mise en place sur les filaments branchiaux. De tels comportements semblent maximiser le contact entre le corps de *U. cyprinae* et le tissu branchial de l'huître. Ceci appuie l'hypothèse que le tégument du ver joue un rôle actif dans le transfert des nutriments entre son corps et le milieu externe (Noury-Sraïri *et al.* 1990).

## 2. Références

Noury-Sraïri N, Justine JL et Euzet L (1990) Ultrastructure du tégument et des glandes sous-épithéliales de *Urastoma cyprinae* («Prolecithophora»), turbellarié parasite de Mollusque. Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, 13<sup>e</sup> Série 11:53-71

Ward JE (1996) Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. J Invert Biol 115(3):218-231

Ward JE, Beninger PG, MacDonald and Thompson RJ (1991) Direct observations of feeding structures and mechanisms in bivalve molluscs using endoscopic examination and video image analysis. Mar Biol 111:287-291

Ward JE, Levinton JS, Shumway SE and Cucci T (1998) Particle sorting in bivalves: in vivo determination of the pallial organs of selection. Mar Biol 131:283-292.

Figure 1. Micrographies endoscopiques d'*U. cyprinae* sur les filaments branchiaux de l'huître *Crassostrea virginica*. (a) *U. cyprinae* dans le flux de mucus (flèche) du sillon dorsal. (b-d) *U. cyprinae* sur les filaments branchiaux démontrant des comportements spécifiques tels que l'arquage du corps (flèche). [og] pore oral-génital



