



UFR Sciences Exactes et Naturelles

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

**ROLE DE LA MOULE, MYTILUS EDULIS,
DANS LA TRANSMISSION
DU PARASITE DE L'HUITRE PLATE,
MARTEILIA REFRINGENS**

69075
EG30-FAU.R
042635

Mémoire de stage de maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie
option physiologie microbienne

Mémoire présenté, par Stéphanie FAURE
Le 9 septembre 2002

Responsables de stage : Dr Franck BERTHE et Dr Frédérique LE ROUX

Ifremer

Laboratoire de Génétique et Pathologie
IFREMER La Tremblade
17390 Ronce les Bains
Tél. : 05.46.36.98.36.

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à Monsieur Philippe GOULLETQUER, responsable de la station IFREMER de la Tremblade, pour m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein du laboratoire de génétique et pathologie.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Christian VIVARES pour m'avoir conseillée pour le choix de ce stage.

Je remercie également tous mes enseignants, qui m'ont conseillée, encouragée (et supportée...) durant cette année universitaire.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Franck BERTHE pour m'avoir acceptée en stage.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement au Docteur Frédérique LE ROUX qui m'a encadrée tout au long de ce stage. Durant toutes ces semaines, j'ai bénéficié de son savoir, qui m'a beaucoup apporté. Merci pour ta confiance, ton humour, ton caractère de breton bien trempé, et pour tous les moments passés ensemble.

Je tiens à remercier Mélanie du fond du cœur, car elle m'a toujours aidée, elle a su me diriger dans la bonne voie. Merci pour tous ces moments privilégiés que j'ai eus avec toi, la confiance que tu m'as donnée, ta gentillesse, ta patience et tout le reste qui fait que tu restes toi-même.

Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire de génétique et pathologie, qui n'ont jamais refusé de m'aider : Maeva (vive les petits plats chinois et Tahiti bien sur), Bruno (l'œil de lynx des parasites), Isabelle (ma collègue de bureau...ma correctrice...), Nolwenn (vive les steaks flambés), Vassilia (la reine de l'électrophorèse), Jean-Pierre (qui compatit pour le mal de dos...), Céline (spécialiste en maladies des mollusques), Lionel (pour l'initiation à la pêche en mer).Merci aussi à l'inépuisable Marie-Jo (experte en petits coins cachés de moules).

Je remercie aussi Florence, Martine, Delphine, Serge, Raphaël, les 2 Pascal, Fred, Stéphane de la log.(vive les voitures !)qui ont facilité mon séjour, et qui ont souvent résolu mes petits problèmes. Je remercie l'ensemble de la station pour leur joie de vivre, surtout les Mickeys qui sont spécialistes en la matière (n'est ce pas Stéphane !), Jean-Phi, Jean-Côme et ceux que j'ai oubliés.

Merci à tous mes colocataires qui ont dû me supporter pendant 3 mois, Dam's, la p'tite Guéna, Grégoire, Valérie(merci pour ces petits plats !), mon petit Drôle Landais préféré, et mon Breton favori, sans qui la vie aurait été bien moins drôle !

Merci à mes parents, mon frère, toute ma famille, mes amis, et Cédric qui m'ont soutenue et qui ont toujours eu confiance en moi.

ABREVIATIONS

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

dNTP : Désoxyribonucléotide

BET : Bromure d'Ethidium

DEL : Direction Environnement et aménagement du Littoral

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

H : heure

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER

ITS : Interval Transcript Sequence, intervalle transcrit

LCPC : Laboratoire Conchylicole de Poitou Charentes

LGP : Laboratoire de Génétique et Pathologie

NaCl : chlorure de sodium

M.maurini : *Marteilia maurini*

M.refringens : *Marteilia refringens*

min : minute

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

OIE : Office International des Epizooties

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation enzymatique en chaîne

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TAE : Tris acetate EDTA (tris acetate 0,04M, 1mM EDTA)

Taq : *Thermophilus aquaticus*

Tris : hydroxymethyl aminomethane

UV : Ultra Violet

<u>PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL</u>	p1
<u>INTRODUCTION</u>	p3
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	p5
I) <u>Approches expérimentales</u>	p5
II) <u>Techniques</u>	p5
1) Matériel biologique	p5
2) Frottis	p6
3) PCR/ PCR.RFLP	p7
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	p10
I) <u>Mise au point</u>	p10
1) Extraction d'ADN	p10
2) PCR	p10
II) <u>Présence de parasite</u>	p10
1) Dans les fécès	p10
2) Dans la moule	p11
III) <u>Typage du parasite</u>	p11
1) Dans les fécès	p11
2) Dans la moule	p12
IV) <u>Discussion</u>	p14
<u>REFLEXION PERSONNELLE</u>	p15
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p16



PRESENTATION DE LA
STRUCTURE D'ACCUEIL

L'IFREMER

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER

1/ Sur le plan national

L'IFREMER est un Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial.

Il a été fondé le 5 juin 1984 et résulte de la fusion entre le Centre National pour l'Exploitation de l'Océan et l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes.

Son budget annuel est de 150 millions d'euros qui proviennent en partie des subventions accordées par l'Etat.

L'IFREMER emploie 1380 salariés.

Il est constitué de 5 centres (Boulogne-sur-mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti) et 72 laboratoires ou services de recherche, répartis en 24 stations sur tout le littoral métropolitain et dans les départements et territoires d'outre mer.

Ses missions

Les missions de l'institut sont la recherche et le développement technologique pour la connaissance de l'océan et de l'exploitation des ressources marines.

Soit :

- Connaître, évaluer, prévoir l'évolution des ressources des océans et permettre leur exploitation durable,
- Améliorer les méthodes de surveillance, de prévisions, d'évolution, de protection et de mise en valeur du milieu marin et côtier,
- Favoriser le développement socio-économique du monde maritime,
- Avoir un rôle de service public (aide à la décision), de conseil et d'expertise auprès de l'Etat, des collectivités territoriales, des milieux professionnels de la mer (marins, pêcheurs, aquaculteurs), et aussi des industriels de la transformation et de la valorisation des ressources maritimes.

2/La station de La Tremblade



La station Ifremer de La Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral.

Elle regroupe 3 laboratoires :

➤ un laboratoire côtier de la Direction Environnement et aménagement du Littoral (DEL) dont les missions consistent à mettre en œuvre des réseaux de surveillance garantissant aux conchyliculteurs et aux consommateurs une qualité des eaux et des coquillages.

➤ le LCPC (Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes) qui étudie entre autres la croissance des coquillages, afin d'améliorer les productions du bassin Marennes-Oléron.

➤ le LGP (Laboratoire de Génétique et Pathologie) qui est spécialisé en génétique et pathologie des bivalves marins.

Une cinquantaine de salariés y travaille de façon permanente.

Directeur de la station : Philippe GOULLETQUER

3/Mon service : le LGP

Le LGP est Laboratoire Communautaire de Référence pour les maladies des mollusques et Laboratoire de Référence pour l'Office International des Epizooties (OIE) pour la marteillose et la bonamiose, deux parasitoses affectant l'huître plate, *Ostrea edulis*.

Ses fonctions consistent en l'entretien d'une collection de matériel de référence histologique, ADN, collection de bactéries congelées, la mise au point de méthodes de diagnostic des principaux agents pathogènes, la formation et l'information d'experts, et l'assistance à la Commission Européenne et l'OIE.

J'ai effectué mon stage dans l'équipe pathologie du LGP, et plus particulièrement sur le thème d'étude de la marteillose, développée par le Dr F. Berthe.



INTRODUCTION

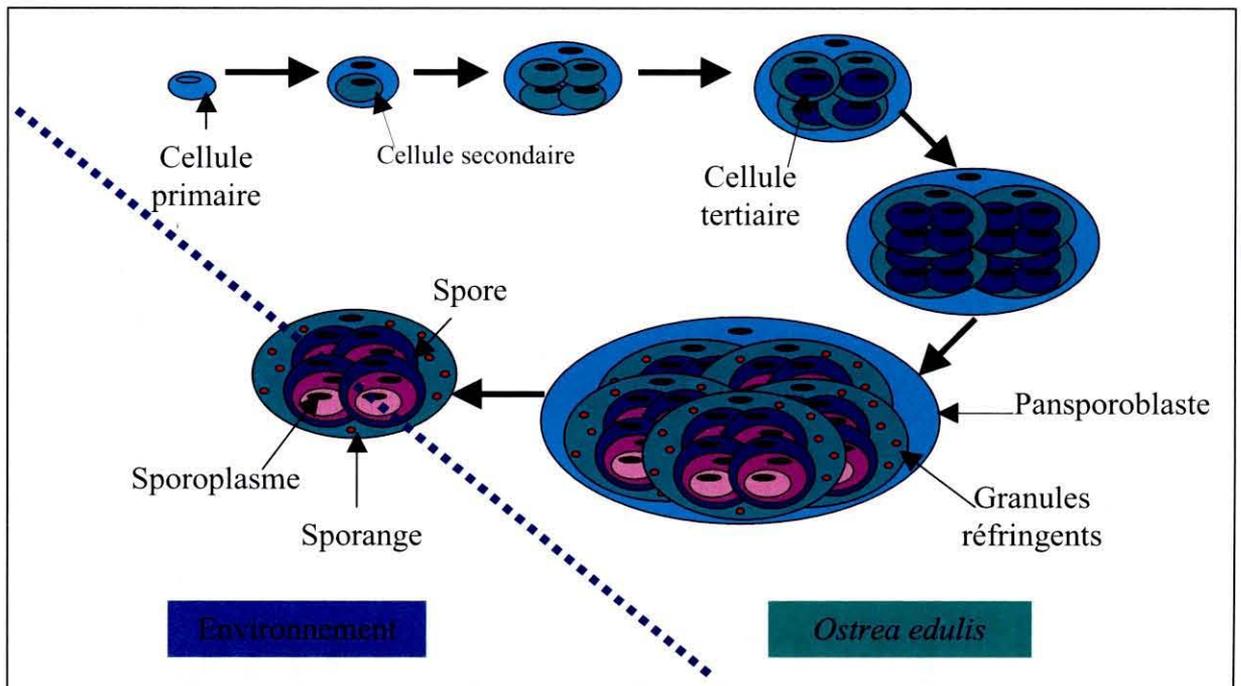


Figure 1 : cycle de développement de *Marteilia refringens* chez son hôte *Ostrea edulis*, d'après Lubat 1990.

La marteiliose, ou maladie des Abers, est la maladie causée par l'agent parasitaire *Marteilia refringens*. Les premières observations de ce parasite datent de la fin des années 60. Au cours de l'été 1968, une mortalité anormale frappe jusqu'à 90% des huîtres plates *Ostrea edulis* de l'Aber Wrach, rivière située sur la côte nord de la Bretagne (Herrbach, 1971). Au cours des années précédentes, des mortalités pouvant atteindre 50% avaient déjà été observées (Alderman, 1979). Herrbach (1971) met en évidence des cellules sphériques uninucléées qui semblent évoluer vers des cellules polynucléées donnant des sporanges caractérisés par la présence de corpuscules réfringents.

Malgré ces mortalités anormales, aucune mesure visant à limiter les transferts d'huîtres plates n'est mise en place. Ainsi, dès la fin de l'été 1969, des mortalités anormales d'huîtres plates d'origine bretonne placées en claire du bassin de Marennes-Oléron sont observées. Comps (1970), note d'ores et déjà le caractère très localisé de la maladie qui ne touche que deux des claires utilisées. Comme Herrbach (1971), Comps (1970) décrit des éléments polynucléés associés aux mortalités. Ces cellules particulières seront identifiées comme correspondant à différents stades de développement de *Marteilia refringens*, parasite décrit par Grizel *et al.* (1974).

Marteilia refringens est un parasite extracellulaire de la glande digestive. Les différents stades de développement du parasite chez *Ostrea edulis* se situent principalement au niveau des épithéliums de l'estomac, des canaux et diverticules digestifs, de l'intestin et du rectum.

La structure de base du parasite est localisée au niveau de la bordure marginale de l'épithélium stomacal (Grizel *et al.*, 1974). Elle est représentée par une cellule souche ou cellule primaire contenant une à plusieurs cellules secondaires incluses dans son cytoplasme. A ce niveau, le parasite ne paraît pas provoquer de lésions ni entraîner de réactions hémocytaires. Les formes matures du parasite sont localisées au niveau des diverticules digestifs. Les cellules primaires contiennent alors jusqu'à huit cellules secondaires (Cf. Figure 1). Ces dernières se divisent de manière endogène en 4 cellules tertiaires. Enfin, chaque cellule tertiaire contient trois cellules emboîtées l'une dans l'autre. Il est proposé d'appeler les cellules secondaires sporanges (Lubat, 1990). Chaque cellule primaire contient donc 8 sporanges, chacune contenant 4 cellules tertiaires ou spores. Les sporanges vont acquérir des inclusions caractéristiques, les granules réfringents, de nature protéique mais dont la fonction reste aujourd'hui encore inconnue. Au stade ultime de la maturation, il y a rupture de la membrane cytoplasmique de la cellule

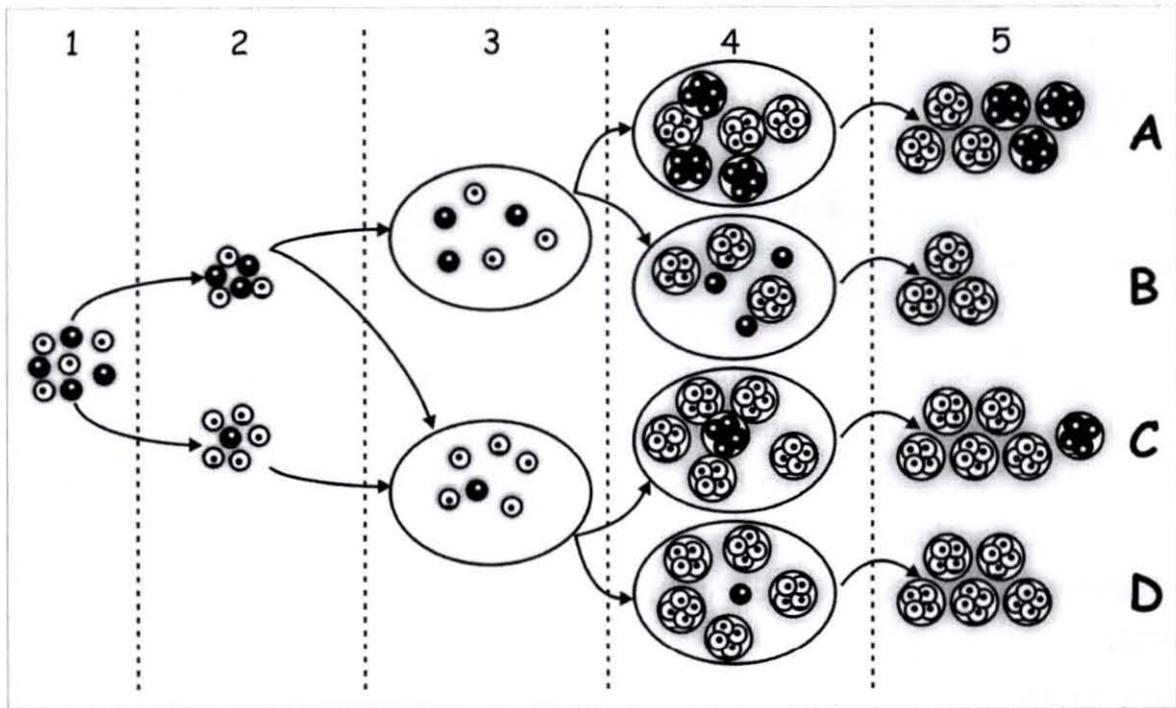


Figure n°2 : Modèle conceptuel des flux géniques entre *Marteilia refringens* et *Marteilia maurini*. Sur le schéma, *Marteilia maurini* est figuré en blanc et *M. refringens* en noir. L'hôte considéré est la moule, *Mytilus edulis*.

primaire, les sporanges sont alors libérés dans la lumière des diverticules digestifs puis de l'intestin. Le parasite est disséminé dans l'environnement via les fèces et les sporanges ont valeur de propagules.

Une étude sur la taxinomie de *Marteilia refringens* basée sur le gène codant pour la petite sous-unité ribosomique (18S) a montré que la séquence de ce gène est la même que le parasite soit purifié à partir d'huîtres plates ou de moules (Berthe *et al.*, 2000 ; Le Roux *et al.*, 1999). Ces résultats semblaient confirmer ceux d'un autre groupe montrant que *Marteilia maurini* parasitant la moule, *Mytilus edulis*, ne pouvait pas être différencié de *Marteilia refringens* parasitant *Ostrea edulis* sur les seuls critères ultra structuraux utilisés pour la description initiale de ces espèces (Longshaw *et al.*, 2001). Toutefois, si l'on considère d'autres arguments, notamment la distribution géographique du parasite chez ses deux hôtes principaux, l'huître et la moule, la question reste ouverte.

L'étude de l'intervalle transcrit (ITS 1) du gène codant pour les sous unités ribosomiques a montré qu'il existait un dimorphisme de séquence entre les 2 espèces. La séparation de *Marteilia* en au moins deux types l'un appelé O, présent chez *Ostrea edulis*, l'autre M présent chez *Mytilus* spp. a été proposée. Ces résultats valideraient l'existence de l'espèce *Marteilia maurini* = type M (Le Roux *et al.*, 2001).

De rares cas de coinfections par ces deux types de parasites, chez la moule et chez l'huître plate, ont été mis en évidence. Le but de mon étude est de savoir, dans les cas de coinfection chez *Mytilus edulis*, si la moule est vecteur du parasite de l'huître plate, c'est à dire si le cycle du type O est complet chez cet hôte.

En effet, plusieurs hypothèses de figure peuvent expliquer la détection des deux parasites chez la moule (Cf. Figure 2) :

- les moules sont porteuses du parasite et propagent la maladie (cas A et C), ce qui donnerait lieu à une réglementation pour le transport des moules
- les moules sont un cul de sac pour les parasites (cas B et D).

MATERIEL
ET
METHODES

I) Approches expérimentales

Afin d'évaluer si la moule, *Mytilus edulis*, est vecteur du parasite *Marteilia refringens*, nous avons recherché la présence d'ADN de ce parasite dans les fécès de moule, attestant d'un cycle biologique complet chez cet hôte.

Actuellement, le seul moyen de discriminer *Marteilia refringens* de *Marteilia maurini* est d'effectuer une technique de biologie moléculaire : la PCR-RFLP (Le Roux *et al.*, 2001). Cependant, lors de ce stage, nous avons mis au point l'utilisation d'un couple d'amorces permettant la discrimination des 2 espèces de parasites par PCR directement.

Après récupération des fécès de moules, une observation microscopique est faite pour confirmer la présence de parasite, puis après extraction de l'ADN des fécès, on analyse par PCR-RFLP et par PCR quel parasite (*M.maurini* ou *M.refringens*) est présent dans les fécès de la moule.

II) Techniques

1) Matériel biologique

➤ Echantillonnage :

Les moules ont été prélevées à la Trinité en Bretagne, zone où les cas de moules et d'huîtres coinfectées avaient été décelés (Le Roux *et al.*, 2001).

➤ Stockage

Les moules ont été stockées à 11°C et la température a été augmentée jusqu'à 22°C, car une étude préalable a montré que le relargage des parasites dépendait de la température (Berthe *et al.* 1998 ; Audemard *et al.*, 2001).

Ensuite, on a placé 288 moules dans des casiers individuels en eau chaude, à 22°C.

➤ Récolte des fécès

Les prélèvements des fécès se sont faits tous les 2 ou 3 jours avec une pipette de 10mL.

Les fécès sont regroupées en 24 tubes, soit 1 tube pour 12 moules.

➤ Conservation

A la fin de l'expérience, des frottis de glande digestive ont été réalisés pour détecter le parasite. Les animaux infectés ont été coupés en deux. La moitié a été fixée en Davidson puis incluse en paraffine et l'autre moitié a été congelée à -20°C .

Solution de Davidson : - eau de mer 1200mL

- alcool 95° 1200mL
- formaldéhyde 38% 300mL
- glycérol 400mL
- acide acétique glacial 10%

2) Frottis

Après ouverture d'une moule, un fragment de la glande digestive est prélevé, légèrement séché sur un papier absorbant et on l'applique sur une lame de verre. Le kit hémacolor quick staining est utilisé pour colorer les structures cellulaires. La lame est incubée dans un premier bain (hémacolor 1 constitué principalement de méthanol, fixateur des tissus) pendant 2 minutes, puis dans 2 bains successifs (hémacolor 2 et 3) pendant 2 minutes. La lame est rincée sous l'eau, puis séchée.

3) PCR/ PCR-RFLP

➤ Extraction d'ADN

- à partir de l'animal

L'animal congelé à -20°C est broyé, on ajoute 10 volumes de solution de lyse (NaCl 100mM, EDTA 25mM pH 8, SDS 0,5 %, Tris 5mM pH 8) à laquelle de la protéinase K 0,1mg/mL a été ajoutée. Après incubation d'une nuit à 55°C , un volume V (500 μL) de solution de lyse est mélangé avec un volume de phénol et un volume de chloroforme (alcool isoamylique 24:1). Les protéines sont retenues par la phase phénolique (interface blanchâtre) et les acides nucléiques sont présents dans la phase aqueuse. Les tubes sont vortexés et centrifugés 10 min à 10 000 rpm. La phase aqueuse supérieure est récupérée et les acides nucléiques sont précipités par 1/10 V d'acétate de sodium 3M pH 5,4 et 2,5V d'éthanol absolu. Après une incubation d'au moins 30 minutes à -20°C , et une centrifugation de 10 min

à 10 000 rpm, le culot est lavé par 1 mL d'éthanol à 70° et séché. Les acides nucléiques sont remis en suspension dans 50 µL d'eau.

- à partir des fécès

Les fécès sont centrifugées 30 min à 3500 rpm pour pouvoir éliminer l'eau de mer, et conservés à - 20°C. Le protocole d'extraction est le même que précédemment. L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de 500 µL ou de 5 mL de lysat. Dans ce dernier cas, les volumes de phénol, de chloroforme, d'alcool et d'acétate de sodium ont été ajustés.

➤ Contrôle de l'ADN extrait

La spectrométrie permet de contrôler qualitativement et quantitativement la préparation d'ADN. La densité optique (DO) à 260 nm mesure la quantité d'ADN et la DO à 280 nm la quantité de protéines. La contamination en protéines est mesurée par le rapport DO 260/ DO 280 qui doit être voisin de 1,7.

L'ADN est aussi contrôlé par migration électrophorétique en gel d'agarose à 0,7% dans du tampon TAE 1X (Tris Acétate EDTA).

➤ Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR est utilisée pour amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un fragment d'acide nucléique situé entre 2 séquences connues (Saiki et al, 1985). 100 ng d'ADN sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant le tampon de l'enzyme, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM d'un mélange de désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 µM de chaque oligonucléotide et 2,5 U de Taq DNA polymérase (Silverstar, eurogentec). La réaction PCR est effectuée par un thermocycleur programmé comme suit :

- une étape de dénaturation 5 min à 94°C
- 30 cycles de 3 étapes : 1) dénaturation à 94°C 1 min 2) hybridation des amorces dont la température dépend de la séquence des amorces 3) élongation à 72°C pendant 1 min
- une étape d'élongation terminale de 10 min à 72°C

L'amplification est contrôlée après migration électrophorétique en gel d'agarose 1% dans du tampon TAE 1X, coloration par l'agent intercalant bromure d'éthidium et visualisation des acides nucléiques aux UV.

➤ Choix des amorces

Le dimorphisme *refringens/maurini* a été mis en évidence à partir de l'ITS 1.

3 couples d'amorces correspondant à cette région ont été utilisés :

- le couple appelé M2S/M3AS permet d'amplifier un fragment de 413pb chez les 2 espèces. (Le Roux et al., 2001)
- un couple permettant d'amplifier spécifiquement un fragment de 363pb de *Marteilia refringens* appelé M2S/Prex1H.
- un couple permettant d'amplifier spécifiquement un fragment de 362pb de *Marteilia maurini* appelé M2S/Prex1M.

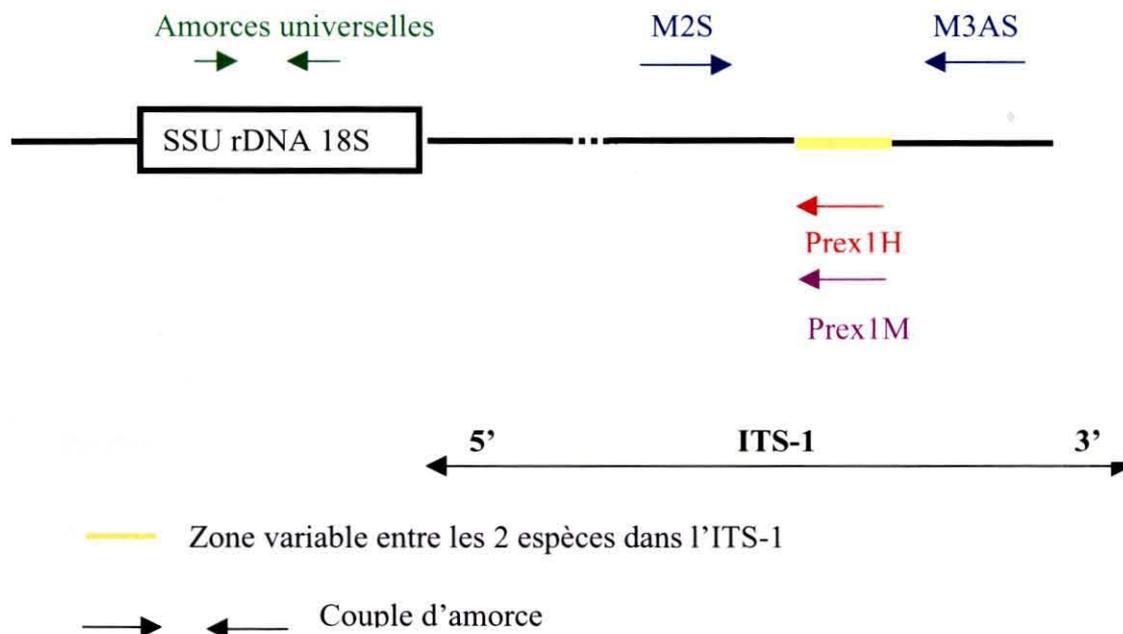


Figure 3 : Positionnement des amorces sur la zone à amplifier

➤ Digestion enzymatique

Une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *HhaI* permet de discriminer le produit PCR obtenu avec les amorces M2S/M3AS correspondant à *Marteilia maurini* et/ou *Marteilia refringens*.

10µL de produit PCR sont digérés dans 20µL contenant 2µL de tampon 10X de l'enzyme et 1µL d'enzyme à 37°C pendant 1H.

Le produit de digestion est analysé sur un gel d'agarose à 2%.

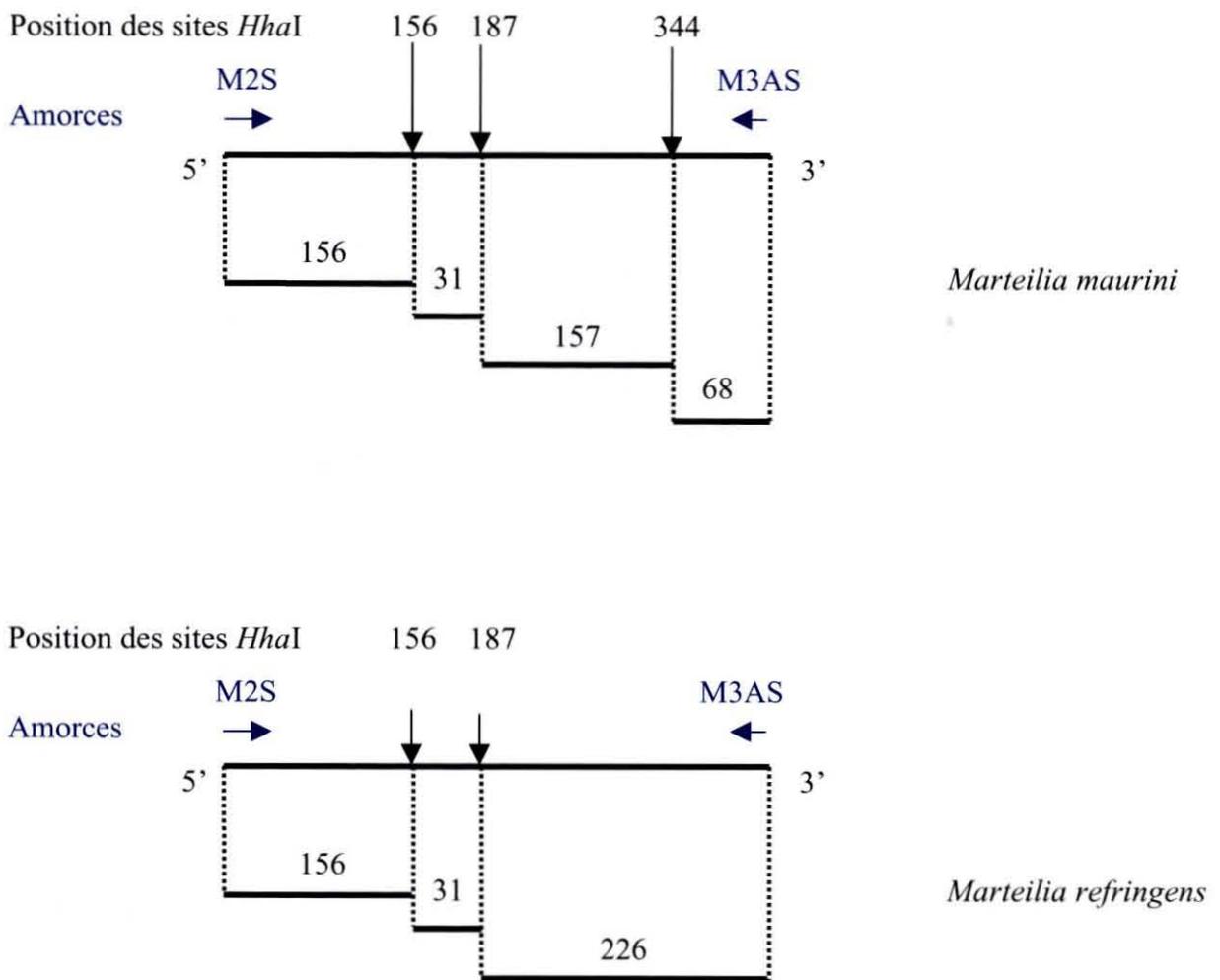


Figure 4 : Schéma explicatif des sites de restriction *HhaI* dans l'ITS 1

RESULTATS
ET
DISCUSSION

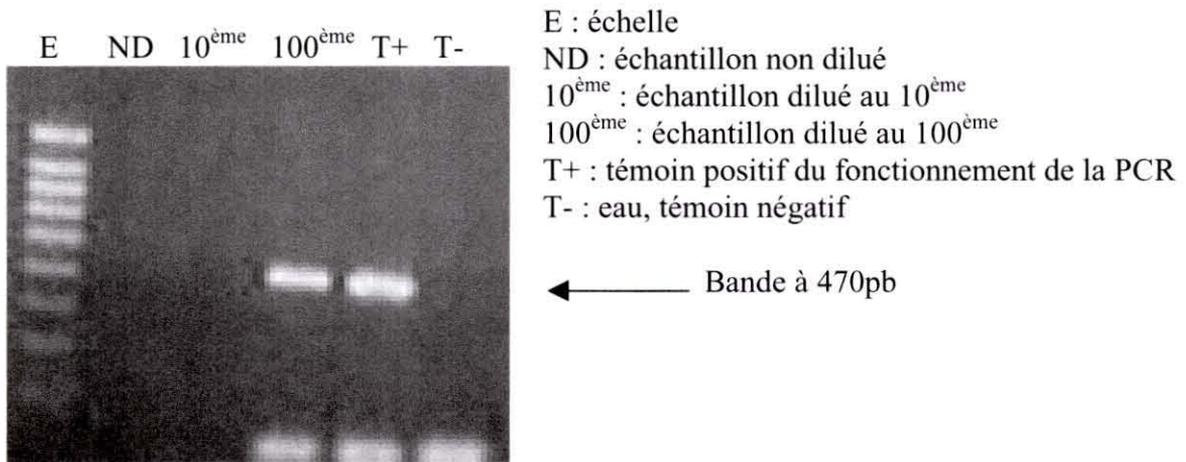


Figure n°5 : gel(agarose 1%). Produits PCR avec les amorces universelles. Tests des dilutions.

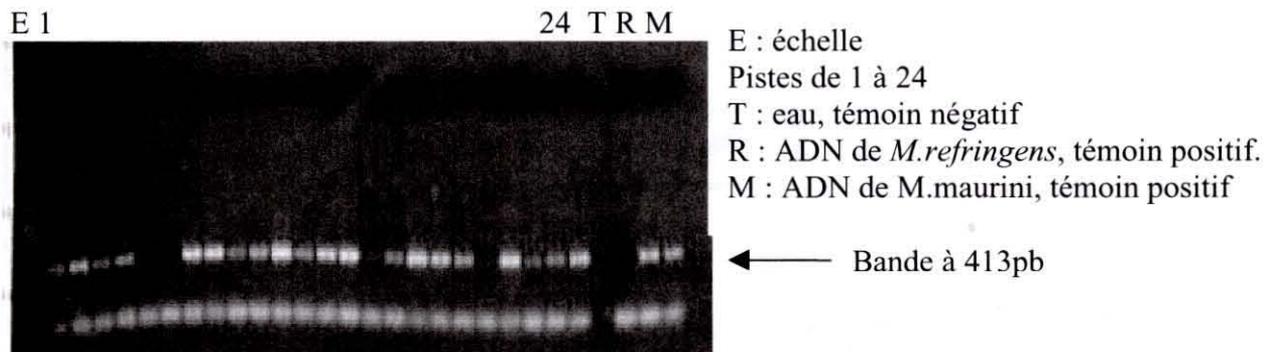


Figure n°6 : gel(agarose 1%). Produits PCR avec les amorces M2S/M3AS.

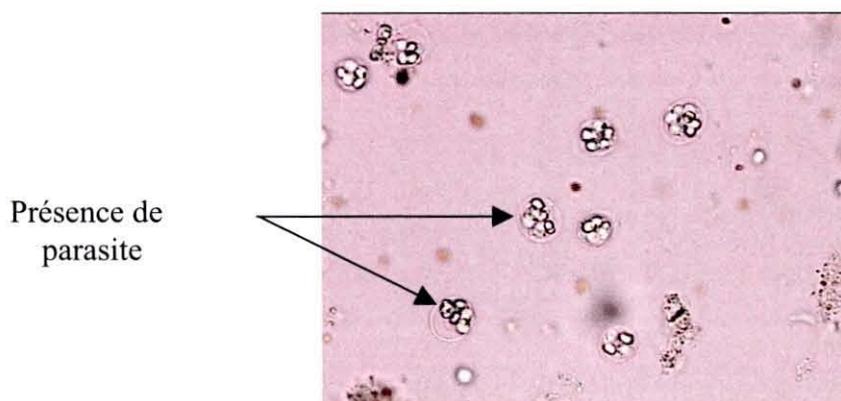


Figure n°7 : Observation microscopique des fécès de moules et visualisation du parasite.

I) Mise au point

1) Extraction d'ADN et validation de la réaction de PCR

L'extraction d'ADN à partir des fécès de moule a nécessité des mises au point en raison de la présence de substances inhibitrices de la réaction de PCR dans les extraits et de la faible quantité d'ADN présent.

Des amorces universelles amplifiant un fragment du gène 18S ont été utilisées pour valider l'extraction d'ADN.

Les premiers essais ont été réalisés avec 500 μ L de lysat, puis les suivants avec 5mL. Les réactions ne fonctionnaient pas dans les 2 cas, même avec les amorces universelles.

C'est pourquoi, on a essayé de faire des dilutions successives pour arriver à la concentration à laquelle les substances inhibitrices ne gênaient plus la réaction. L'ADN a été dilué au 10^{ème}, puis au 100^{ème}. Une amplification a été observée pour la dilution au 100^{ème} (Cf. Figure 5), ce qui correspond à une concentration de 1,5ng/ μ L

2) Réaction de PCR avec les amorces Prex

L'addition de 1,5ng d'ADN par réaction de PCR a été retenue et une première série de réaction a été effectuée avec les amorces M2S/M3AS (Cf. Figure n°6)

Dans le cas de l'utilisation des amorces Prex1H et Prex1M, plusieurs températures d'hybridation ont été testées, et les meilleures amplifications ont lieu quand la température d'hybridation est 55°C.

II) Présence de parasite dans les fécès

1) Dans les fécès

Le parasite est détecté dans les fécès de moule par microscopie optique sur un aliquot de fécès (environ 200 μ L suffisent) que l'on place sur une lame recouverte d'une lamelle. On observe des propagules des parasites.

Cf. figure 7

Cellule tertiaire

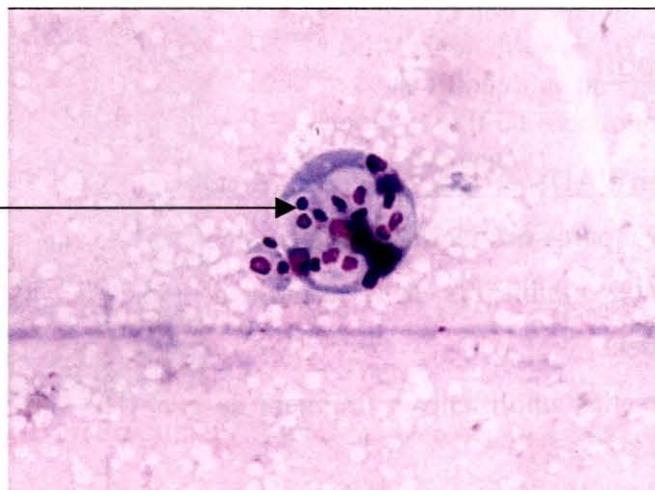


Figure n°8 : Frottis de glande digestive de moule pour détection du parasite.

E 1 2 3 24 T R M



← Bande à 362 pb

E : échelle
Pistes de 1 à 24
T : eau, témoin négatif
R : ADN de *M.refringens*, témoin négatif.
M : ADN de *M.maurini*, témoin positif

Figure n°9 : gel d'agarose 1% avec les produits d'amplification des amorces M2S/Prex1M

E 1 2 24 T R M



← Bande à 363 pb

E : échelle
Pistes de 1 à 24
T : témoin
R : ADN de *M.refringens*, témoin positif
M : ADN de *M.maurini*, témoin négatif

Figure n°10 : gel d'agarose 1% avec les produits d'amplification des amorces M2S/Prex1H

2) Dans les moules

La détection du parasite dans la moule se fait par frottis. Différents stades du parasites sont observés. Cf. figure 8

Après observation microscopique des frottis de glande digestive, seules 100 moules apparaissent infestées sur 285 moules, soit 35,1% d'infestation. Durant l'expérience, trois moules sont mortes.

III) Typage du parasite

1) Dans les fécès

Après extraction d'ADN des fécès, une PCR est effectuée pour différencier les 2 parasites. On observe les résultats sur des gels d'agarose 1%.

Avec le couple d'amorces M2S/Prex1M, on observe qu'une bande à 362 pb est présente, ce qui confirme la présence de *Marteilia maurini* dans les fécès des moules.

Par contre, avec le couple d'amorces M2S/Prex1H, aucune bande n'apparaît, ce qui témoigne qu'il n'y a eu aucune amplification. (Cf. figures 9 et 10)

Nombre de tube par prélèvement	24
Nombre de prélèvement	10
Nombre total d'échantillons	240
Nombre d'amplification avec les amorces M2S/Prex1M	240
Nombre d'amplification avec les amorces M2S/Prex1H	0

Tableau 1 résumant les résultats obtenus sur les fécès de moule

Après avoir analysé tous les échantillons avec les deux couples d'amorces discriminantes des deux espèces de parasites, *Marteilia refringens* n'a pas été retrouvé dans les fécès de moules.

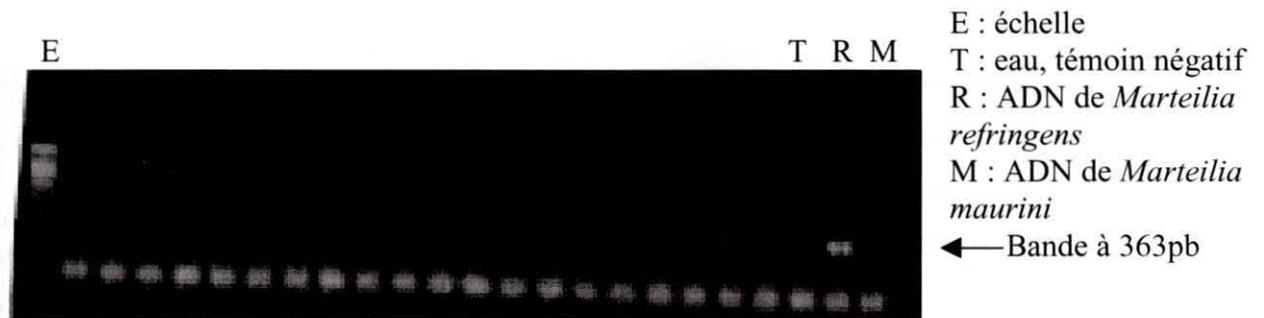


Figure n°10 : Exemple de gel (agarose 1%). Produits PCR avec amorces M2S/Prex1H.



E : échelle
 T : eau, témoin négatif
 R : ADN de *Marteilia refringens*
 M : ADN de *Marteilia maurini*
 Figure n°11 : Exemple de gel (agarose 1%). Produits PCR avec amorces M2S/Prex1M.

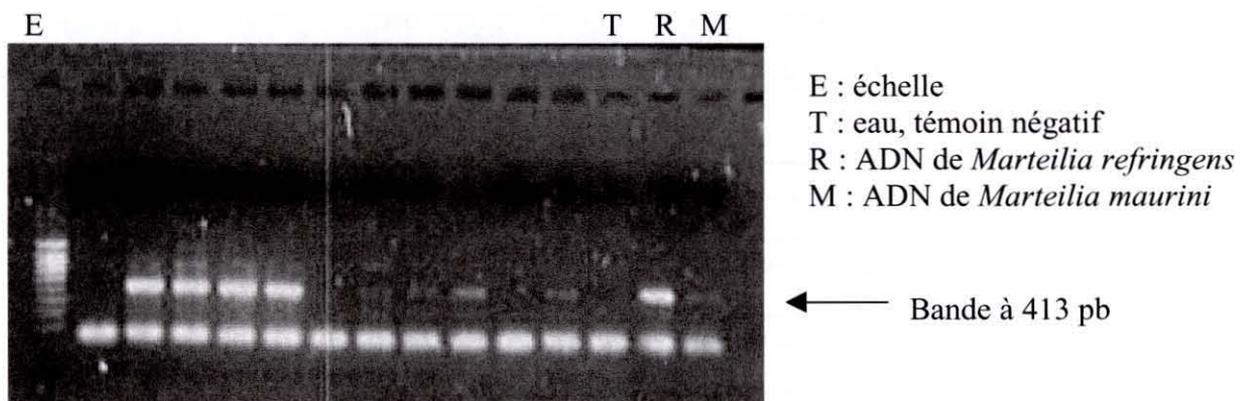


Figure n°12 : Exemple de gel (agarose 1%). Produits PCR avec amorces M2S/M3AS.

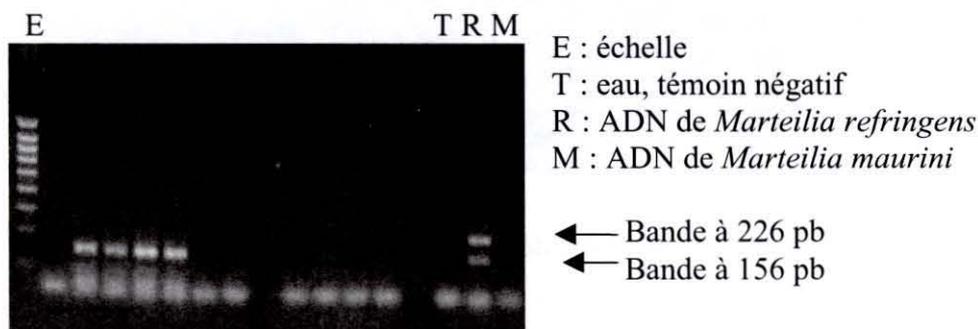


Figure n°13 : Exemple de gel (agarose 2%). Produits de la digestion par *HhaI* après amplification par les amorces M2S/M3AS

2) Dans les moules

Après avoir extrait l'ADN des 100 moules, on a effectué 3 types de PCR avec les 3 couples d'amorces.

Cf. les figures n°11, 12, 13, 14.

Sur la figure 11, aucune bande n'apparaît sauf dans le témoin avec de l'ADN de *M.refringens*. Ceci signifie que ce parasite n'est pas présent dans la moule.

Sur la figure 12, on aperçoit une bande à 362 pb, qui correspond à de l'ADN de *M.maurini*. Dans certaines pistes, il n'y a pas de signal, donc pas de parasite, comme la piste 2. La bande à 500 pb environ correspond à une hybridation non spécifique, qui n'existait pas avec les fécès. La quantité d'ADN est peut-être en cause, les concentrations d'ADN ne sont pas les mêmes.

Sur la figure 13, la bande à 412 pb correspond bien au produit de PCR attendu, qui confirme la présence de parasite du genre *Marteilia*. La figure 13 permet de discriminer les 2 parasites, et seul *M.maurini* est présent.

Nombre de moules	100
Nombre de moules présentant une amplification avec le couple d'amorces M2S/Prex1M	84
Nombre de moules présentant une amplification avec le couple d'amorces M2S/Prex1H	0
Nombre de moules présentant une amplification avec le couple d'amorces M2S/M3AS	80
Nombre de moules présentant un profil de restriction identique à <i>M.maurini</i> après digestion par <i>HhaI</i>	80
Nombre de moules présentant un profil de restriction identique à <i>M.refringens</i> après digestion par <i>HhaI</i>	0
Nombre moyen de moules étant infestées par <i>M.maurini</i>	82

Tableau 2 résumant les différents résultats obtenus

D'après les résultats du tableau 2, sur les 100 moules sélectionnées, seules 82 sont infestées par *M.maurini*. Les signaux positifs obtenus en frottis peuvent être expliqués par une contamination de la pince, qui a servi pour prélever un échantillon de glande digestive. Si une moule est fortement infestée, et que la pince est mal nettoyée, le frottis de la moule suivante présente peu de parasite, mais cette moule est conservée comme positive. Pour ce problème, il aurait fallu être plus vigilant sur la façon de nettoyer la pince, et noter le taux d'infestation de chaque moule.

On remarque aussi que le nombre de moules infestées n'est pas le même suivant le couple d'amorces utilisé (84 pour M2S/Prex1M, 80 pour M2S/M3AS + digestion). Ceci peut s'expliquer par la meilleure sensibilité des amorces M2S/M3AS.

Une bande à 500pb spécifique est obtenue avec le couple d'amorces M2S/Prex1M (CF. Figure 12). Les conditions plus stringentes devraient être mises au point pour diminuer ce bruit de fond tout en conservant la bande spécifique : variation de la concentration en $MgCl_2$, température d'hybridation des amorces, quantité d'ADN de moule.

IV) Discussion

Nous n'avons pas été en mesure de détecter l'ADN de *Marteilia refringens* dans les 285 moules analysées. Alors qu'en 2000, 2 à 3% de coinfection avaient été décelés dans des moules à la Trinité. Nous confirmons donc que la coinfection est un événement rare.

Ces résultats négatifs ne permettent donc pas de conclure sur le statut de la moule dans le cycle de *Marteilia refringens*.

En conséquence, le transfert de moules coinfectées vers des zones indemnes de marteiliose peut constituer un risque même si l'incidence de cet événement est faible.

Dans notre étude, la difficulté a été de mettre au point les conditions de PCR pour permettre la détection de *Marteilia* à partir des fécès de moules. Même si cette technique est extrêmement développée depuis 1985, elle nécessite une adaptation de protocole d'extraction et d'amplification en fonction du matériel étudié. La difficulté est renforcée en biologie marine en raison de l'extrême diversité des espèces utilisées.

Les nouvelles amorces discriminantes des deux espèces pourront être utilisées pour détecter ces deux types de parasites dans les tissus par des techniques d'hybridation *in situ* ou d'élongation/ marquage d'ADN *in situ*.

En conclusion, l'étude du développement de *Marteilia refringens* dans la moule nécessite un plus grand nombre d'animaux coinfectés. Une exposition des moules, en période d'infestation dans les claires ostréicoles (cycle de *Marteilia refringens* complet chez l'huître, très forte prévalence) sera effectuée pour tenter d'infester ces animaux par *Marteilia refringens*.

REFLEXION
PERSONNELLE

Au cours de ce stage, j'ai pu mettre en pratique mes acquis théoriques.

Aujourd'hui, je comprends pourquoi certains problèmes scientifiques ne sont pas résolus aussi rapidement qu'on le souhaiterait. Dans le cadre de mon stage, j'ai consacré plus de temps que prévu à la mise au point de la réaction de PCR permettant de détecter les parasites dans les fécès de moules. Cette étape préalable était nécessaire à l'étude de *Marteilia refringens* dans les fécès de moules.

Cette expérience de 3 mois a surtout été pour moi l'occasion d'intégrer une équipe de recherche, donc d'appréhender la vie de laboratoire d'une manière différente. Les facteurs déterminants pour le bon fonctionnement et le dynamisme d'un laboratoire sont, de mon point de vue, l'esprit d'équipe et la gestion du matériel (consommables et équipement).

Pour conclure, ce stage a été très enrichissant pour moi, tant sur le plan scientifique que personnel.



BIBLIOGRAPHIE

ALDERMAN D. J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Marine Fishery Review* 41, 67-69.

AUDEMARD C., BARNAUD A., COLLINS C. M., LE ROUX F., SAURIAU P.-G., COUSTAU C., BLACHIER P., & BERTHE F. C. J. (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies : new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257, 87-108.

BERTHE F.C.J., M. PERNAS, M. ZERABIB, P. HAFFNER, A. THÉBAULT, & A. J. FIGUERAS (1998). Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34 : 135-144.

BERTHE F.C.J., F. LE ROUX, E. PEYRETAILLADE, P. PEYRET, D. RODRIGUEZ, M. GOUY & C.P. VIVARES (2000). The existence of the phylum Paramyxia Desportes and Perkins, 1990 is validated by the phylogenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47(3) : 288-293.

COMPS M. (1970). Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 34, 317-326.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J.R., COUSSERANS F., DUTHOIT J.L., & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. *Sci. Pêche. Bull. Inst. Pêches marit.* 240:7-29.

HERRBACH B. (1971). Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35, 79-87.

LE ROUX F., C. AUDEMARD, A. BARNAUD, & F.C.J. BERTHE (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1 (6) : 588-597

LE ROUX F., G. LORENZO, P. PEYRET, C. AUDEMARD, A. FIGUERAS, C. VIVARÈS, M. GOUY & F.C.J. BERTHE (2001). Molecular Evidence for the Existence of Two Species of *Marteilia* in Europe. *Journal of Eukaryotic Microbiology* : 48 (4) : 449-454.

LONGSHAW M., FEIST S. W., MATTHEWS A. & FIGUERAS A. (2001). Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Diseases of Aquatic Organisms* 44, 137-142

LUBAT V. (1990). Approches biologiques et moléculaires dans l'étude des myxosporidies, du PKX et des *Marteilia*. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 118 p.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALCOMA F., MULLIS K.S., HORN G.T., ERLICH H.A. ET ARNHEIM N. (1985). Enzymatic amplification of globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

