

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
CLERMONT II

UNIVERSITE D'Auvergne
CLERMONT I

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Diplome d'Etudes Approfondies de Biologie
Module : Biologie des Protistes

Essais de caractérisation moléculaire des parasites du genre
Marteilia (Phylum Paramyxia) à l'aide de l'ADNr

Présenté par **David RODRIGUEZ**
Le 15 Septembre 1997

Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie
Station IFREMER de Ronce Les Bains
BP 133
17390 La Tremblade

Equipe de Protistologie Moléculaire et Cellulaire
des Parasites Opportunistes
Laboratoire de Biologie Comparée des Protistes
UPESA CNRS 6023
63177 Aubière cedex

Responsables de Stage : Pr. C. VIVARES et F. BERTHE

Remerciements

Je remercie Monsieur Jacques Bohatier, Directeur de l'UPESA CNRS 6023, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Christian Vivarès pour la confiance qu'il m'a toujours témoigné et pour m'avoir permis de poursuivre ce sujet avec son équipe.

Il est donc normal que je remercie toutes les personnes qui animent ce laboratoire, Pierre Peyret et Guy Metenier pour leurs conseils précieux, Corinne Biderre Eric Peyretailade Francis Duffieux et Frederic Delbac, pour leur patience et leur aide.

Je tiens à remercier André Gérard pour m'avoir accueilli dans le Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie de la Station IFREMER de La Tremblade.

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont permis d'apprendre pendant presque un an au sein de cette station, tout ce qu'il ne fallait pas faire.

Je tiens à accorder une mention particulière à Manuela qui m'a soutenu et encouragé tout au long de cette période et qui par sa présence a su me faire tirer parti de toutes les épreuves rencontrées.

Résumé

Les parasites du genre *Marteilia* sont responsables de graves épizooties et sont retrouvés dans une communauté très variable de mollusques bivalves marins. Toutefois ces protistes restent difficiles à classer à l'intérieur du genre du fait que les données morphologiques sont insuffisantes pour distinguer avec précision deux espèces données. Ceci est le cas pour *Marteilia refringens*, affectant l'huître plate *Ostrea edulis* ou la moule (*Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*), *Marteilia sp.* et *Marteilia maurini* affectant les deux espèces de moules. C'est pourquoi, nous avons tenté d'isoler, par PCR, le gène codant pour l'ARN 18S, les ITS₁ et ITS₂, ainsi que le gène codant pour l'ARN 5,8S des parasites présents chez l'huître plate et la moule (*M.edulis*), dans le but de réaliser l'analyse systématique et phylogénétique. Le fait qu'il n'y ait aucune donnée moléculaire sur ce parasite ou des parasites proches nous a contraint à utiliser des amorces universelles. Malheureusement, malgré la réalisation de chromatographies d'affinité de cellules parasitaires, une contamination par l'ADN de l'hôte a été constatée avec, pour conséquence, l'isolement des ITS et de l'ARN 5,8S de *M. edulis* jusque là inconnus. Néanmoins, un protocole de purification par gradient de Percoll a permis de prévenir toute autre contamination. Ainsi, un contig de 244 pb a été réalisé par la technique de SSP-PCR, contenant une partie de l'extrémité du gène codant l'ARNr 18S de *Marteilia sp.* Ce dernier est utilisé à l'heure actuelle pour isoler le gène complet. Ces données devraient nous permettre d'amplifier celui de *M.refringens* afin d'effectuer une étude comparative.

Abstract

Protists from the genus *Marteilia* are a complex group of pathogenic parasites found in numerous marine bivalves molluscs. These protists are very difficult to classify inside the genus itself. If we consider *M. refringens*, pathogen of the flat oyster *Ostrea edulis*, also found in mussel (*M. edulis*), and *M. maurini* found in *M. galloprovincialis* and *M. edulis*, significant differences only based on morphological observation are very difficult to find. Molecular isolation using PCR, and sequencing of genes coding for rRNA 18S, 5.8S, and intertranscribed spacers, was tried for systematic and phylogenetic analysis using parasites coming from *O.edulis* and *M. edulis*. Because no molecular data exist on these organism or related protists we used universal primers for PCR. Notwithstanding chromatographic immunopurification of parasites, DNA contamination always led us to amplify genes from host such as isolate undiscovered ITS with 5.8S RNA genes from *Mytilus edulis*. Nevertheless, with another protocol of purification based on Percoll gradients, and another approach called SSP-PCR, we perform a contig of 244bp containing a segment of 18S rRNA gene from *Marteilia sp.* This contig will allow us to isolate the complete sequence of this gene and the corresponding gene in *M. refringens*, for their comparative study.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

INTRODUCTION 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 3

1 Historique 3

2 Cycle de développement 4

2.1 La cellule primaire 4

2.2 Les présporanges 4

2.3 Les cellules tertiaires 4

3 Pathogénicité du parasite 5

3.1 Symptômes 5

3.2 Effets pathogènes 5

3.2.1 Histopathologie 5

3.2.2 Contradictions 6

3.2.3 Hypothèses 7

4 Epidémiologie 7

4.1 Réceptivité de l'hôte 7

4.2 Effets des facteurs environnementaux 8

4.2.1 Température 8

4.2.2 Salinité 8

4.2.3 Renouvellement d'eau 8

5 Systématique 9

5.1 Position Taxinomique de *M. refringens* 9

5.2 Les espèces du genre *Marteilia* 9

| | |
|---|----|
| MATERIEL ET METHODES | 11 |
| I Purification des cellules parasitaires | 11 |
| 1 Sélection des mollusques les plus parasités | 11 |
| 1.1 Frottis de glande digestive | 11 |
| 1.2 Coloration | 11 |
| 1.3 Observation en Microscopie optique | 11 |
| 2 Isolement des parasites | 12 |
| 2.1 Enrichissement de fractions parasitaires | 12 |
| 2.2 Purification de <i>Marteilia</i> par gradient de Percoll | 13 |
| 2.3 Purification de <i>Marteilia</i> par chromatographie d'affinité | 13 |
| II Isolement des séquences nucléiques | 15 |
| 1 Extraction de l'ADN génomique | 15 |
| 2 SSP-PCR | 15 |
| 2.1 Principe | 15 |
| 2.2 Digestion enzymatique | 16 |
| 2.3 Extraction d'ADN digéré | 16 |
| 2.4 Déphosphorylation | 16 |
| 2.5 Ligature | 16 |
| 3 Amplification | 17 |
| 4 Electroélution | 17 |
| 5 Clonage des fragments amplifiés | 18 |
| 6 Extraction plasmidique | 18 |
| 7 Digestion des clones recombinants | 19 |
| 8 Séquençage | 19 |

| | |
|---|----|
| RESULTATS DISCUSSION | 20 |
| 1 Purification de <i>Marteilia</i> | 20 |
| 1.1 Isolement par immunoaffinité | 20 |
| 1.2 Purification par centrifugation en gradient de Percoll | 20 |
| 2 Amplification des séquences nucléiques d'intérêt | 21 |
| 2.1 Problème rencontré avec l'ADN extrait après gradient de Percoll | 21 |
| 2.2 Amplification des séquences contenant l'ARN 18S | 21 |
| 2.3 Isolement des ITS de <i>Marteilia</i> provenant de <i>M. edulis</i> | 21 |
| 3 Séquençage et comparaison des séquences | 22 |
| 3.1 Contamination par de l'ADN de l'hôte | 22 |
| 3.2 Isolement des ITS de <i>M. edulis</i> | 23 |
| 4 SSP-PCR | 23 |
| 4.1 Test des amorces universelles | 23 |
| 4.2 Amplification et isolement de clones supplémentaires | 24 |
| | |
| CONCLUSION | 25 |
| | |
| ANNEXE | |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | |

ABREVIATIONS

- ADN** : acide desoxyribonucléique
- ADNr** : acide desoxyribonucléique ribosomique
- ARNr** : acide ribonucléique ribosomique
- ATP** : adénosine triphosphate
- CE** : communauté européenne
- CIP** : calf intestinal phosphatase
- DAPI** : 4',6-diamidino-2-phenylindole
- dATP** : désoxyadénosine triphosphate
- dCTP** : désoxycytidine triphosphate
- dGTP** : désoxyguanine triphosphate
- dNTP** : désoxynucléoside triphosphate
- DTT** : dithiothréitol
- dTTP** : désoxythymidine triphosphate
- EDTA** : ethylenediamine tetraacetic acid
- EMFT** : eau de mer filtrée tween
- IPTG** : isopropylthio- β -D-galactoside
- ITS** : internal transcribed spacer
- LB** : Luria Bertani
- PCR** : polymerase chain reaction
- pb** : paire de bases
- PBS** : phosphate buffer saline
- SDS** : sodium dodecyl sulfate
- SDS-PAGE** : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- SSP-PCR** : single specific primer polymerase chain reaction
- RNase A** : ribonucléase A
- TBE** : tris borate EDTA
- Tris** : hydroxymethyl aminomethane
- X-Gal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

INTRODUCTION

Introduction

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française avec une production d'environ 150000 tonnes par an, ce qui place la France en troisième position mondiale, derrière le Japon et la Corée. Cependant, le développement de cette activité a été souvent limité par l'apparition de maladies causées par divers agents infectieux (parasites, bactéries, virus). L'importante épizootie à iridovirus sur les côtes françaises, qui a conduit à la disparition quasi-totale de l'huître portugaise *Crassostrea angulata*, en est un exemple parlant.

Dans le même temps, l'huître plate *Ostrea edulis* était victime d'un protiste parasite dont la morphologie particulière a conduit les découvreurs à créer un nouveau genre : le genre *Marteilia*. Ce parasite de la glande digestive en conjonction avec un autre protiste *Bonamia ostreae*, découvert à la fin des années 70, sont responsables de la chute de production de l'huître plate, qui est passée de 20000 tonnes à 1800 tonnes par an actuellement. *Marteilia refringens* reste, un obstacle majeur à la relance de l'huître plate.

Différentes espèces du genre *Marteilia* ont été décrites sur la base de caractères ultrastructuraux (Grizel *et al.*, 1974; Perkins et Wolf, 1976, Comps *et al.*, 1975, Comps 1976, Comps *et al.*, 1982, Comps 1985). L'observation et les mesures réalisées en microscopie électronique à transmission sur plus de 500 cellules matures de *Marteilia* d'huître (*O. edulis*) et de moule (*Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*) n'ont pas permis de différencier des espèces sur ces seuls critères morphologiques (S. Feist communication personnelle). Toutefois, les profils électrophorétiques en gel SDS PAGE de protéines totales extraites des parasites purifiés à partir de moule et d'huître montrent des différences (Robledo, 1994, F. Berthe communication personnelle). Ces résultats pourraient s'expliquer par une différence d'expression liée uniquement à la présence du parasite dans deux hôtes différents. Cependant,

l'hypothèse de l'existence d'espèces supplémentaires au sein du genre *Marteilia* ne doit pas être exclue.

Ces considérations sont de première importance d'un point de vue pratique dans la mesure où la marteiliose est une maladie à déclaration obligatoire au sein de l'Union Européenne (directive 91/67 CE) et où les échanges commerciaux au sein de l'Union sont régis par le statut sanitaire des zones d'origine et de destination des lots d'animaux. Se pose alors le problème de distinguer les hôtes alternatif (n'hébergeant que temporairement ce parasite) des vecteurs passifs tolérant le parasite et jouant ainsi le rôle de réservoir naturel. Il est également utile de connaître la spécificité du parasite pour son hôte.

Il apparaît donc nécessaire d'étudier les populations parasitaires des espèces du genre *Marteilia*, trouvées chez l'huître (*O. edulis*) et la moule bleue (*M. edulis*), au moyen d'outils moléculaires relativement fiables. Pour cela, la caractérisation des gènes codant pour l'ARN 18S des *Marteilia* provenant d'huître plate et de moule et leur comparaison a été envisagée.

Nous rappellerons quelques données concernant ces parasites, avant d'aborder les techniques utilisées. Nos résultats apportent des précisions supplémentaires sur le bloc 18S-ITS₁₋₅,8S-ITS₂ de *M. edulis* par l'approche classique de PCR, et une première information sur la séquence du gène d'ARNr 18S de *Marteilia sp.* issu de *M. edulis*, grâce à la technique de SSP-PCR.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1: Historique

Marteilia refringens, agent de la maladie de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* (figure 1), est responsable d'importantes mortalités chez cette espèce. Ainsi dès 1967, des mortalités excédant plus de 50% , furent observées sur la côte Nord Ouest de Bretagne et tout particulièrement dans l'Aber Wrach. Ce taux de mortalité a atteint 90% au cours du printemps de la même année (Comps, 1970; Herrbach, 1971).

Parallèlement, la maladie fut détectée en 1969 dans le bassin de Marennes Oléron (Comps, 1970), dans l'Aber Benoît, la rade de Brest, et le Bassin d'Arcachon (Herrbach, 1971). Par la suite, ce protiste fut mis en évidence tout au long des côtes bretonnes : en 1972 dans l'estuaire de la Penzé (Grizel et Tigé, 1974) en rivière de Morlaix (Tigé et Morel, 1974), en 1974 et 1975, à Paimpol et Binic, ainsi que dans les rivières d'Auray, de Saint Philibert et de Crach (Grizel *et al.*, 1976). Le parasite a même été détecté en Corse (Franc, 1980).

A l'étranger, *M. refringens* a été signalé dès 1970 sur la pointe Nord de l'Espagne et aux Pays Bas, suite à des exportations d'huîtres plates françaises. Il a entraîné d'importantes mortalités dans les rias espagnoles, mais il ne s'est jamais installé au Pays Bas (Von Banning, communication personnelle). Depuis, il évolue à l'état endémique dans les différents bassins ostréicoles et empêche le renouveau de cette activité.

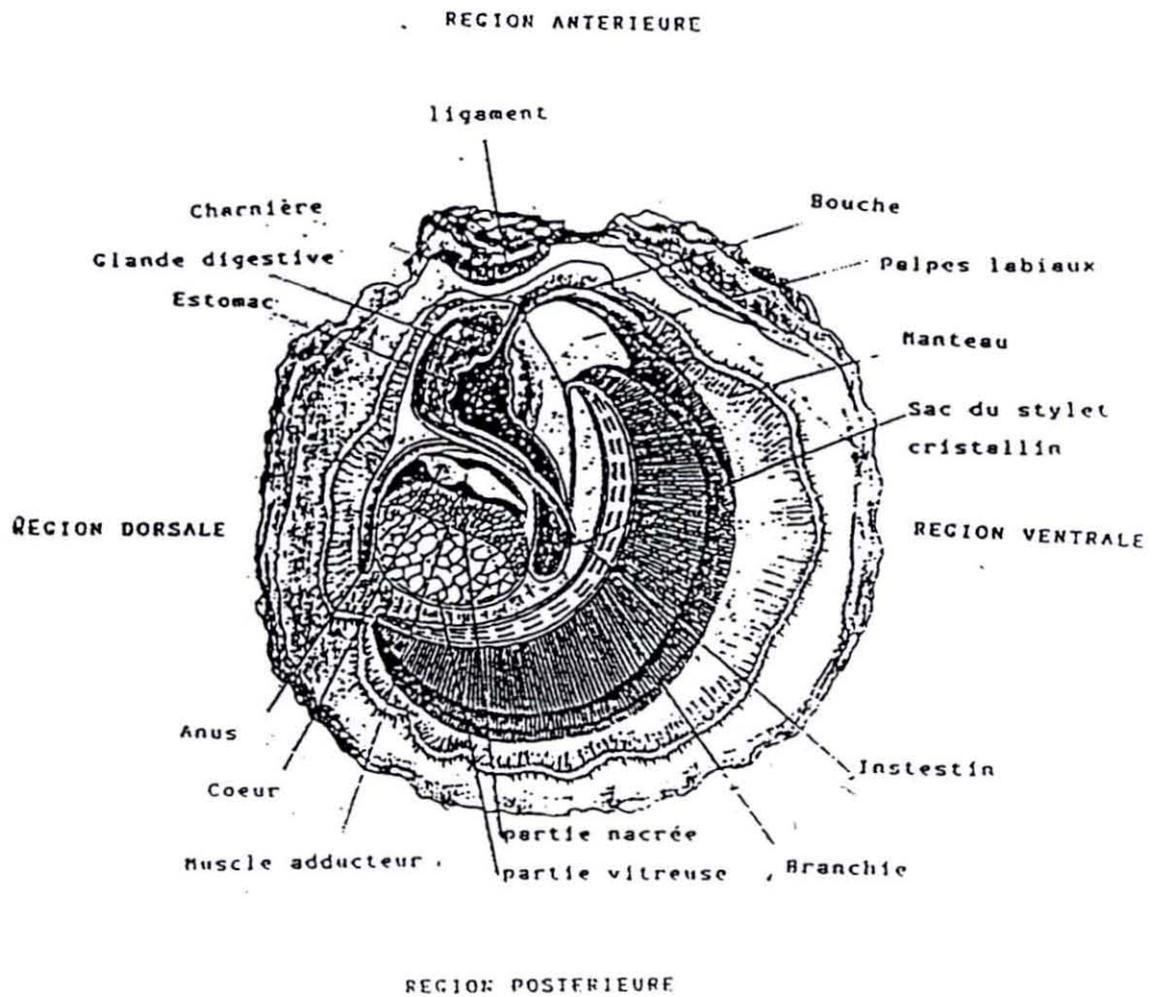


Figure 1 : L'huître plate *Ostrea edulis* (Marteil, 1976)

2 Cycle de développement

2.1 La cellule primaire

Le premier stade du parasite est représenté par une cellule dite primaire (Grizel *et al.*, 1974) ou plasmode (Perkins, 1976) localisé dans l'épithélium cilié de l'estomac (figure 2). Toutefois ces stades précoces peuvent être également observés dans les diverticules digestifs ou dans l'oesophage.

D'un point de vue structural, cette cellule primaire, de forme arrondie et limitée la seule membrane plasmique, présente un cytoplasme de nature légèrement basophile et un noyau peu chromophile avec un volumineux nucléole. Elle contient également du réticulum, des mitochondries, et dans les formes évoluées, des particules d'allure virale dites haplosporosomes sont observables (Perkins, 1976). La taille de cette cellule augmente (de 10 à 30 μm) durant le développement du parasite (Grizel *et al.*, 1974).

2.2 Les présporanges

Une deuxième étape dans le cycle est franchie lorsqu'à l'intérieur de la cellule primaire, une ou plusieurs cellules dites secondaires, ou présporanges (Perkins, 1976), ou sporontes (Desportes 1981) apparaissent. De forme oblongue, la cellule secondaire dépasse rarement 4 à 5 μm de diamètre, présente un cytoplasme très basophile contenant un noyau au nucléole encore volumineux, du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Les cellules secondaires se différencient par un processus de bourgeonnement endogène, à la suite d'une division inégale de la cellule primaire, réalisé par la coalescence de vésicules de type réticulum endoplasmique, délimitant une portion du cytoplasme autour du noyau du sporonte.

2.3 Les cellules tertiaires

Par la suite, il apparaît à l'intérieur des cellules secondaires, qui évoluent en sporanges (Perkins, 1976) ou pansporoblastes (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977), 3 à 4 cellules dites

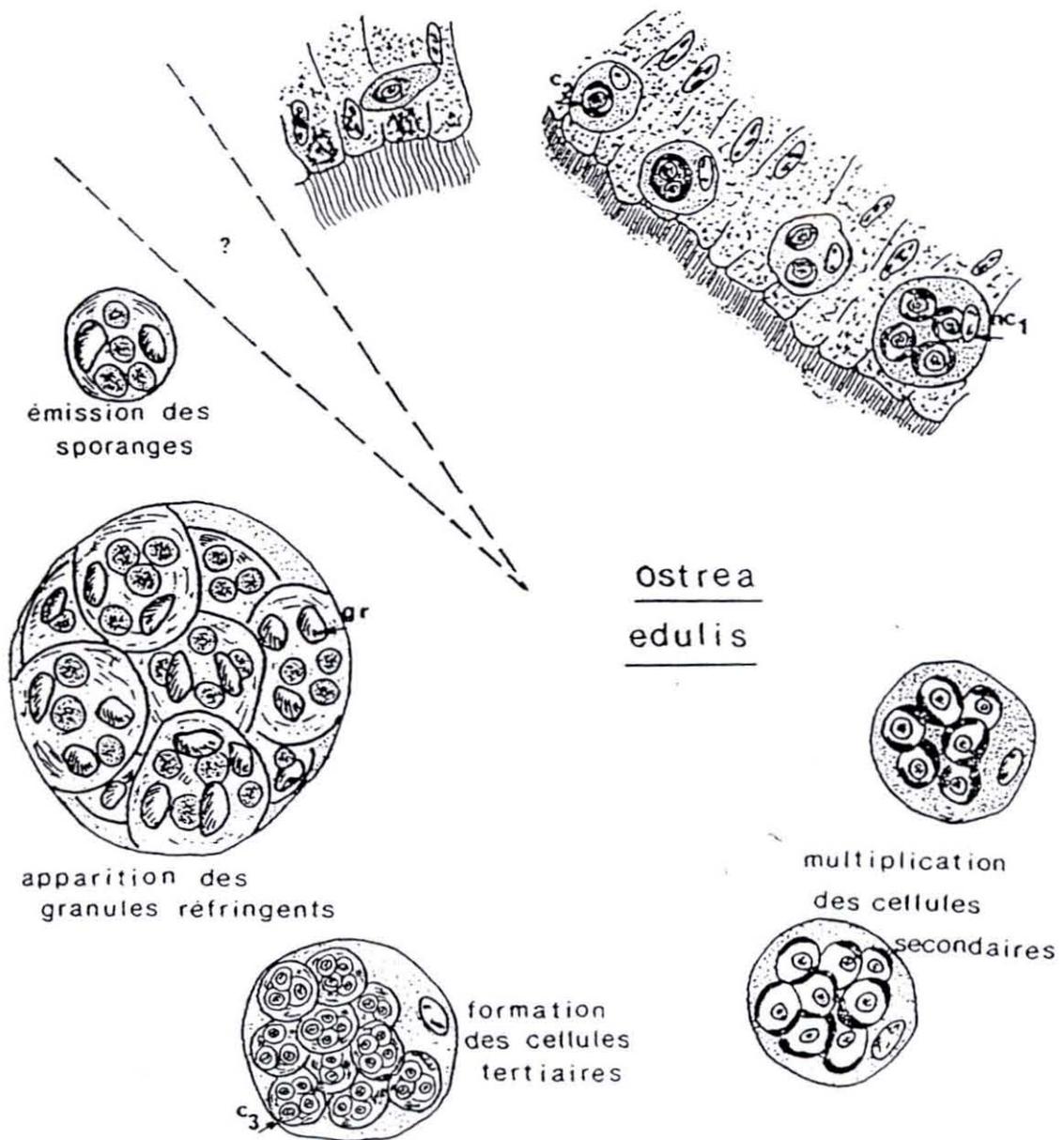


Figure 2: Cycle de développement de *Marteilia refringens* chez *Ostrea edulis* (Grizel *et al*, 1974).
 nc₁: noyau de la cellule primaire; c₂: cellule secondaire; c₃: cellule tertiaire; gr: granule réfringent.

tertiaires (Grizel et *al.*, 1974), d'un diamètre de 3 μ m, à l'intérieur desquelles Perkins (1976) compte 3 sporoplasmes uninucléés. Le premier englobe le deuxième qui englobe à son tour le troisième. Le sporoplasme le plus externe et celui en position moyenne contiennent des mitochondries, alors qu'il n'en a pas été observé dans le sporoplasme le plus interne. La présence d'haplosporosomes dans les sporoplasmes a été signalée.

Parallèlement à l'ensemble de ces formations, des inclusions protéiques importantes apparaissent dans les sporontes, permettant la reconnaissance de ces structures multicellulaires, lors des appositions sur lame de tissus parasités.

La dernière étape de ce cycle est l'éclatement de la cellule primaire qui libérerait ainsi les sporanges dans le système digestif ainsi que dans le milieu extérieur avec pour finalité l'infection d'un hôte intermédiaire probable.

3: Pathogénicité du parasite

3.1 Symptômes

La maladie se manifeste par plusieurs symptômes, soit externes et visibles au niveau de la coquille, soit internes et relatifs à l'état général du mollusque. Toutefois ces signes cliniques ne sont en aucun cas des indicateurs spécifiques de la maladie. La masse digestive, d'ordinaire, est fortement pigmentée c'est-à-dire couleur chocolat. Chez les animaux malades, elle présente un aspect granuleux de couleur brun pâle.

3.2 Effet pathogène

3.2.1 Histopathologie

Les études histopathologiques montrent que lors du développement de la maladie, les

diverticules digestifs sont le siège d'altérations propres à influencer le comportement de l'hôte et l'évolution des lésions est étroitement liée aux phases principales du cycle de développement du parasite. Au cours de la phase de prolifération des formes jeunes, le parasite investit les canaux et tubules digestifs, sans introduire de modifications de l'épithélium digestif. Par contre, lors de la formation des stades les plus mûrs, des modifications notoires interviennent au niveau des cellules et diverticules digestifs.

En effet, l'augmentation de la taille du parasite, inséré entre les cellules épithéliales, se traduit par l'encombrement de la lumière des tubules et la désagrégation de la partie apicale des cellules épithéliales qui présentent souvent des sécrétions anormales. La rupture de l'épithélium libère le parasite dans la lumière des diverticules où sont également présents des débris nécrotiques et des cellules lysées. En fin d'évolution, l'épithélium digestif est profondément altéré, certaines cellules perdent leur ciliature et les cellules sécrétrices régressent.

3.2.2 Contradictions

Bien que les signes cliniques indiqués ci dessus soient associés à la présence du parasite, on peut observer ce dernier chez des huîtres apparemment saines, en état d'engraissement. Ces variations dans le comportement des huîtres parasitées rendent complexe l'analyse de l'interaction hôte-parasite.

Ainsi, l'absence d'altération des cellules digestives (Grizel *et al.*, 1976) et le développement lent du parasite conduit à penser qu'il évolue progressivement aux dépens de l'hôte, sans modifications cellulaires de l'huître. Poder, en 1983, signale des nécroses épithéliales du tractus digestif, accompagnées de réactions hémocytaires limitées. Robledo (1994) nota que l'infestation par *M. refrigens*, ne s'accompagnait pas toujours d'une infiltration hémocytaire de la glande digestive, et le seul cas observé était localisé au niveau des branchies des moules *M. galloprovincialis*, suite à une infestation par des formes primaires de *Marteilia*.

3.2-3 Hypothèses

Le parasite pourrait également se développer aux dépens des cellules épithéliales et en limiter l'activité métabolique en perturbant les fonctions digestives de l'huître. Ainsi pourrait être expliquée la présence de microvillosités entre les cellules primaires du parasite et les cellules épithéliales de l'huître. L'encombrement des diverticules digestifs par de nombreuses formes du parasite, notamment au cours de la période estivale, laisserait supposer une action mécanique de ce dernier par obturation des canaux digestifs.

L'hypothèse d'une sécrétion par le parasite de substances toxiques pour l'huître ne peut être écartée. Toutefois, aucun signe d'une quelconque action toxique sur les tissus n'a pu être décelée, aussi bien en microscopie photonique qu'en microscopie électronique.

Il faut également envisager les effets secondaires de bactéries et parasites rencontrés fréquemment chez les huîtres sujettes à un affaiblissement. En effet, Herrbach (1971) avait noté chez des huîtres parasitées et affaiblies la présence de nombreux ciliés *Ancistrocomidae* et de flagellés (*Hexamita sp.*).

4: Epidémiologie

4.1 Réceptivité de l'hôte

Si *O. edulis* constitue le principal hôte du parasite, les espèces *O. chilensis* (Grizel *et al.*, 1983) et *O. angasi* (Bougrier *et al.*, 1986) semblent sensibles. Il faut signaler la mise en évidence de cet agent pathogène chez la moule *M. edulis* (Tigé *et al.*, 1976) et *M. galloprovincialis* (Comps *et al.*, 1980). Par ailleurs, il est régulièrement observé des formes infectieuses précoces caractéristiques de *M. refringens*, chez *Crassostrea gigas* (Cahour *et al.*, 1979) provenant de la baie de Carantec. Mis en évidence dans 3% des huîtres seulement, il semble plutôt que ces parasites soient captés par les huîtres chez lesquelles ils n'ont pas d'évolution pathologique. (Balouet *et al.*, 1979).

4.2 Effet des facteurs environnementaux

4.2.1 Température

On estime que la période de contamination dans le milieu naturel survient uniquement durant la période estivale. En effet, un taux de parasitisme très faible est noté au cours du mois de Mars et Avril alors que la reprise de l'infection a lieu dès le mois de mai lorsque la température de l'eau devient supérieure à 12°C.

4.2.2 Salinité

La présence du parasite a rarement été signalée dans les eaux franchement océaniques où la salinité varie peu mais qui est plus élevée qu'en zone estuarienne. D'autre part, le transfert d'huîtres plates parasitées des rivières de Bretagne où le taux de salinité est inférieur à 35‰ vers l'étang de Thau dont la salinité varie de 35 à 37‰ s'est traduit par des perturbations du cycle du parasite (Comps, 1970).

4.2.3 Le renouvellement d'eau

Le renouvellement médiocre de l'eau dans le fond des Abers, et des estuaires, zones de prédilection de l'épizootie, est comparable à la dégradation du milieu dans les zones lourdement infestées de la rade de Brest.

5 Systématique

5.1 Position taxinomique de *M. refringens*

Comps (1970) avait associé ce parasite aux Haplosporidies. Herrbach (1971) considérait qu'il s'agissait d'un champignon, membre des Chytridiales. Il a aussi été associé aux Labyrinthomyxa qui comprenaient alors ce qui est connu aujourd'hui comme *Perkinsus marinus* (Apicomplexa). L'appellation *Marteilia refringens* a été proposée par Grizel *et al.* (1974). L'inclusion du genre aux Haplosporidies s'appuie sur la présence d'haplosporosomes, dans le plasmode et dans le sporoplasme des spores, la délimitation du sporoplasme par clivage interne et de la formation des spores à partir des plasmodes. Pour Perkins (1976) l'absence, d'un pore de sortie dans la paroi sporale, et la multiplicité des sporoplasmes ne sont pas selon lui des arguments suffisants pour les séparer des Haplosporidies, rejoignant ainsi les considérations d'Ormières *et al.* (1973).

Cependant, Desportes et Ginsburgel-Vogel (1977) rapprochent *Marteilia* des Myxosporidia, Actinomyxidea et Paramyxida du fait d'une tendance vers la pluricellularité, et de l'absence de plasmode vrai. Ils proposent alors la création d'un nouvel ordre au sein des Cnidosporidia : l'ordre des Marteliidae. Les arguments de Perkins (1976) et Ormières *et al.* (1973) seront toutefois retenus par Sprague (1979) pour maintenir *Marteilia* dans les Haplosporidies.

Desportes (1981) suggère le regroupement des ordres Marteliidea et Paramyxida au sein de la classe des Paramyxia, du phylum des Ascetospora. Desportes et Perkins (1991) ont jugé au vu des particularités de développement des protistes de la classe des marteliidea et de la classe des paramyxidea, que la création d'un nouveau phylum était justifié: le phylum Paramyxia (figure 3).

5.2 Les espèces du genre *Marteilia*

Les organismes composant ce genre ont en commun la caractéristique d'avoir une cellule contenant plusieurs cellules emboîtées. Seules quelques différences structurales ont permis de

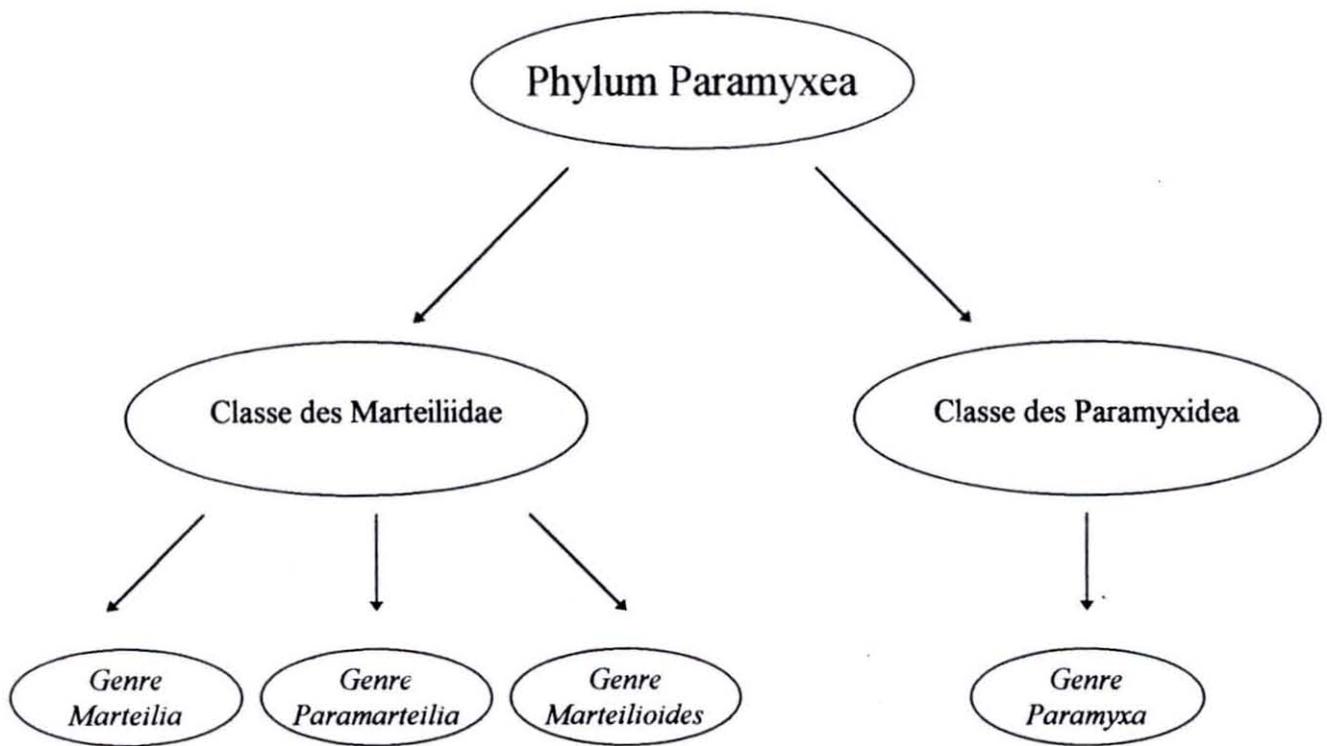


Figure 3: Le phylum Paramyxea. La classification est celle proposée par Desportes et Perkins (1991).

les différencier : nombre de spores, paroi supplémentaire autour des spores, nombre et forme des haplosporosomes.

De cette manière, cinq autres espèces ont été distinguées affectant toutes des mollusques (figure 4). *M. sydneyi* sévit sur les côtes Australiennes en parasitant deux espèces d'huître locales, *Saccostrea commercialis* (Perkins, 1976) et *Crassostrea echinata*. *M. lengehi* affecte *Crassostrea cucullata* (Comps, 1976), huître native du Golfe Persique. *M. maurini* est responsable de mortalités touchant les élevages de moules espagnoles (*M. galloprovincialis* et *M. edulis*). La découverte d'un parasite dont les structures observées dans l'épithélium stomacal de Lavignon (*Scrobicularia piperata*), se rapprochent de celles rapportées pour *M. refringens*, a conduit à la création de l'espèce: *M. christenseni* (Comps, 1985).

Les formes parasitaires dont il n'est fait aucun doute en ce qui concerne leur appartenance au genre *Marteilia*, mais dont les caractéristiques ultrastructurales n'ont pas permis de définir une espèce précise ont été regroupés sous le terme *Marteilia sp.* et sont retrouvés, chez divers mollusques bivalves : *Cerastoderma edule* (Comps, 1975), *Venerupis pullastra* (Poder, 1983), *Venerupis rhomboïdes* (Poder, 1983), *Modiolus modiolus* (Poder, 1983), *Mytilus edulis* (Comps, 1975) et *Mytilus galloprovincialis* (Figueras et al., 1991)

| Parasite | Hôte | Répartition géographique | Source |
|-----------------------------|---|---|--|
| <i>Marteilia refringens</i> | <i>Ostrea edulis</i> <i>O. angasi</i> <i>Tiostrea chilensis</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Mytilus Galloprovincialis</i> | France, Italie Espagne et Portugal | Grizel <i>et al.</i> , 1974 Bougrier <i>et al.</i> , 1986 Grizel <i>et al.</i> , 1983 Cahours, 1979 Comps, 1980 |
| <i>M. maurini</i> | <i>Mytilus edulis</i> <i>M. galloprovincialis</i> | France, Italie, Espagne et Portugal | Poder <i>et al.</i> , 1983 Comps <i>et al.</i> , 1982 |
| <i>M. sydneyi</i> | <i>Saccostrea commercialis</i> <i>S. echinata</i> | Australie | Perkins et Wolf, 1976 Wolf, 1979 |
| <i>M. lengehi</i> | <i>S. cucullata</i> | Golfe persique | Comps, 1976 |
| <i>M. christenseni</i> | <i>Scrobicularia piperata</i> | France | Comps, 1985 |
| <i>Marteilia sp.</i> | <i>Tapes decussatus</i> <i>Cardium edule</i> <i>Modiolus modiolus</i> <i>M. edulis</i> <i>M. galloprovincialis</i> | Espagne, France France France Espagne | Villalba <i>et al.</i> , 1993 Comps <i>et al.</i> , 1975 Poder <i>et al.</i> , 1983 Comps <i>et al.</i> , 1975 Figueras <i>et al.</i> , 1991 |

Figure 4: Les différentes espèces du genre *Marteilia*. Leur localisation géographique et leurs hôtes sont précisés.

MATERIEL
&
METHODES

MATERIELS ET METHODES

I Purification des cellules parasitaires

1-Sélection des mollusques les plus parasités

1-1 Frottis de glande digestive

Trente huîtres plates provenant de l'Abers Wrach ou trente moules provenant de la Trinité, toutes deux étant des zones endémiques, sont ouvertes manuellement. La glande digestive est incisée puis un minuscule fragment de cette dernière est apposée sur lame plusieurs fois (figure 5). Cette opération est réitérée pour l'ensemble des 30 individus analysés, les frottis sont alors fixés au méthanol pendant 30s.

1-2 Coloration

Afin de révéler la présence du parasite et d'estimer le taux d'infestation, qui peut être variable pour chaque mollusque. Les frottis sont colorés selon une technique modifiée de coloration au Giemsa. Pour cela, l'Hémacolor kit[®] (Merck) est employé, il colore habituellement les noyaux basophiles en bleu et le cytoplasme acidophile en rouge des cellules de la glande digestive. A l'inverse, la nature acidophile des noyaux du parasite et la basophilie de son cytoplasme, font que les parasites sont facilement identifiables du reste des cellules rencontrées dans la glande digestive.

1-3 Observations en Microscopie optique

Les formes les plus matures sont facilement observables au grossissement x100. En effet ces dernières se démarquent par leur taille et par leur structure multicellulaire. Deux granules fortement colorés en bleu sont généralement observés avec 4 cellules tertiaires dans lesquelles les sporoplasmes rougeâtres sont observables (figure 6). Avec ces formes sont

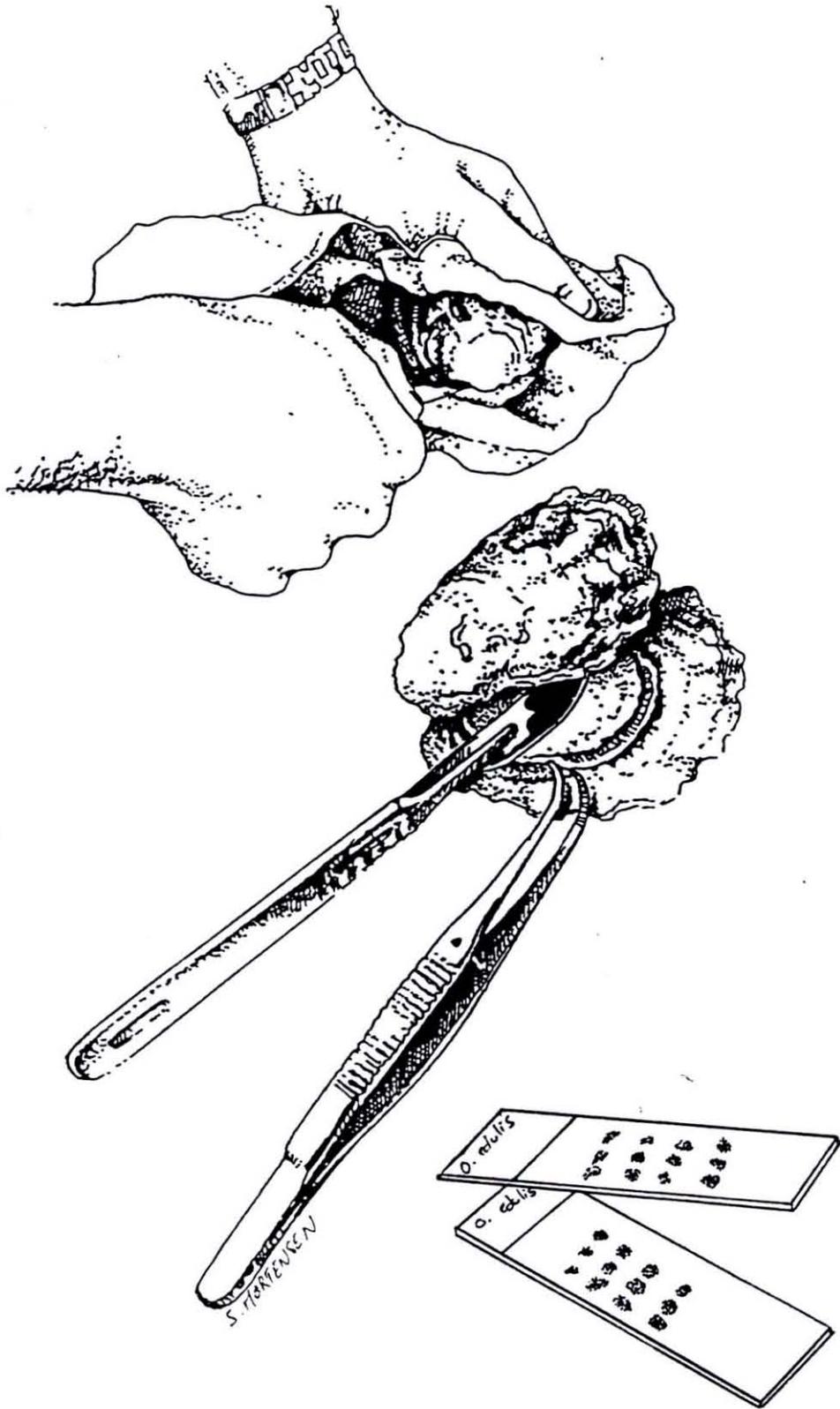


Figure 5 : Diagnostique histologique de la marteilose. L'huître est ouverte avant que la glande digestive soit incisée. Un fragment est prélevé puis apposé sur lame.

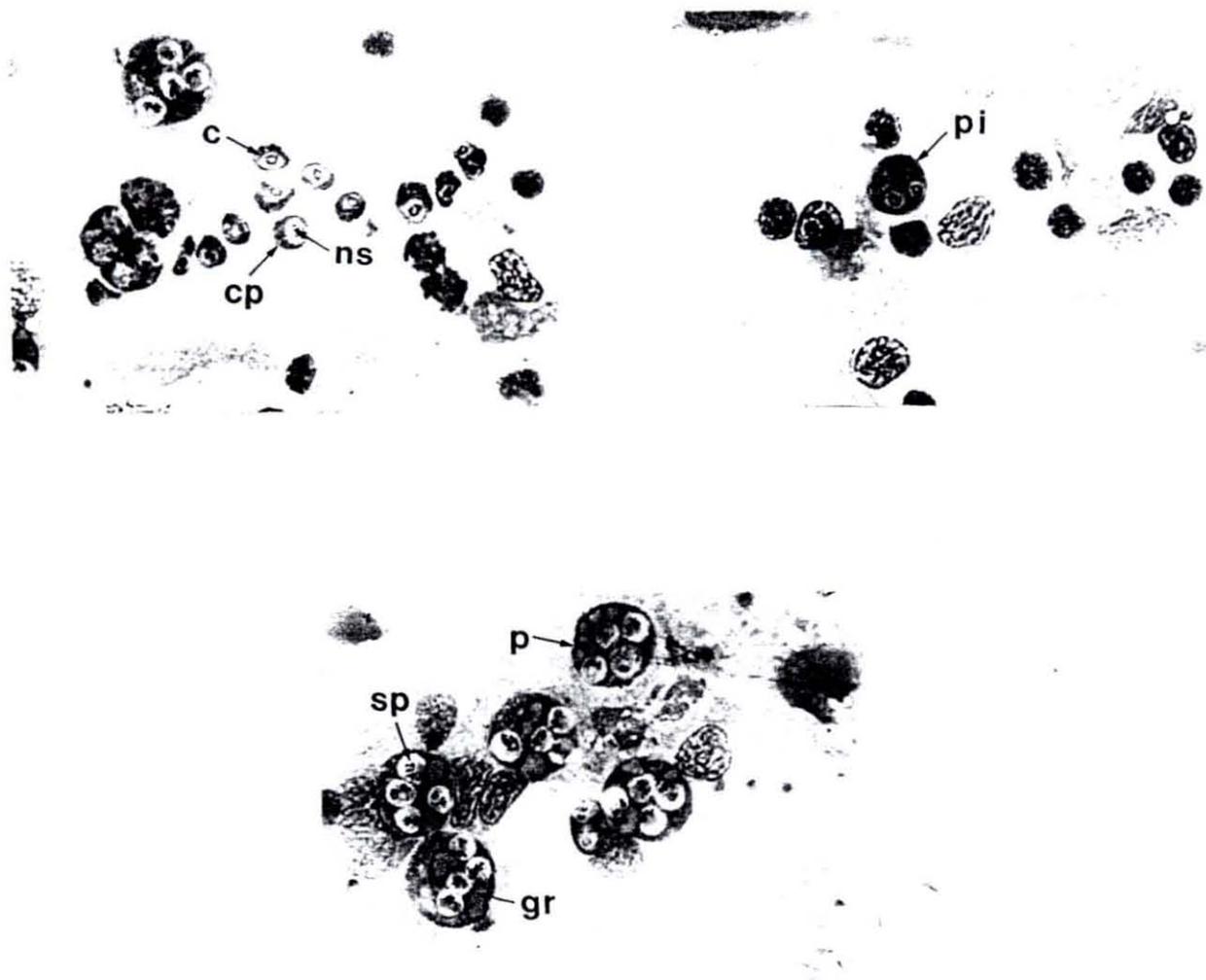


Figure 6 : Apposition sur lame d'un fragment de glande digestive d'*O. edulis* parasitée. Les frottis sont colorés à l'Hémacolor® kit et permettent d'observer au grossissement x1000 les différents stades du développement du parasite. c : cytoplasme. cp : cellule primaire. gr : granule réfringent. ns : noyau de la cellule secondaire. p : pansporoblaste. pi : plasmode immature contenant deux cellules secondaires. sp : spore contenant les sporoplasmes.

associés des stades plus ou moins avancés. Des cellules primaires avec une ou plusieurs cellules secondaires sont observables. De cette façon, les animaux les plus parasités sont isolés et leurs glandes digestives finement disséquées.

2 Isolement des parasites

2-1 Enrichissement de fractions parasitaires

Celles ci ont été réalisées conformément aux premières étapes du protocole établi par Robledo *et al.* (1994). Trois glandes digestives sont broyées à l'ultraturax dans 5 ml d'eau de mer filtrée (0,22 μ m) additionnée de Tween 80 à 1% (EMFT). Le broyât est tamisé progressivement à travers un filtre de Nylon 250 μ m puis 75 μ m afin d'éliminer les gros débris. Le produit de filtration est ensuite clarifié par l'ajout de 45ml d'EMFT et par centrifugation (2500g, 30 min., 4°C).

Le culot obtenu est redilué dans 3 ml d'EMFT et déposé sur un gradient discontinu de sucrose (5%-35%) en EMFT (2500g, 30min., 4°C). Les pansporoblastes sont culottés tandis que les cellules primaires sont concentrées à l'interface 5/35. Ces dernières ne seront pas conservées dans les prochaines étapes de la purification. En effet, ces formes étant plus difficiles à caractériser au sein de la faune complexe composant la glande digestive (algues et protistes divers), seul les pansporoblastes dont la facilité d'observation à tous les stades de la purification nous permet d'évaluer le taux de contamination de nos fractions purifiées ont été récupérés (figure 7).

Pour cela une observation différentielle a été réalisée en microscopie photonique et au microscope à épifluorescence grâce à une solution de DAPI à 2 μ g.ml⁻¹, 50% de méthanol, qui permet, en conservant l'intégrité des structures cellulaires d'observer les noyaux des cellules et donc de différencier les parasites des autres cellules uninucléées (figure 8).

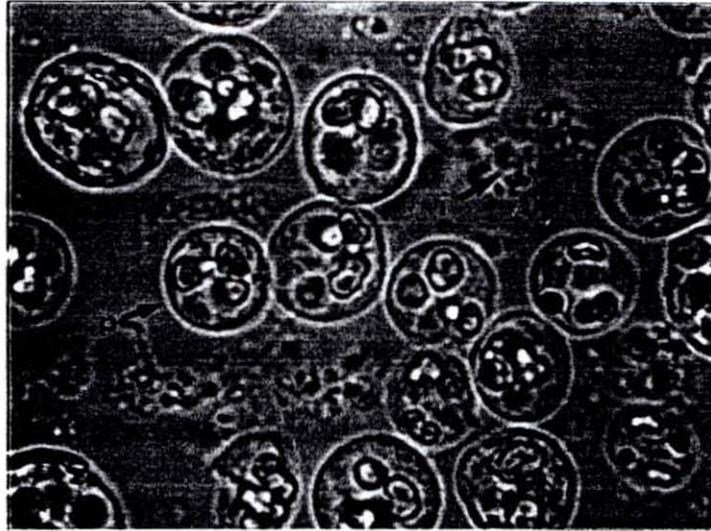
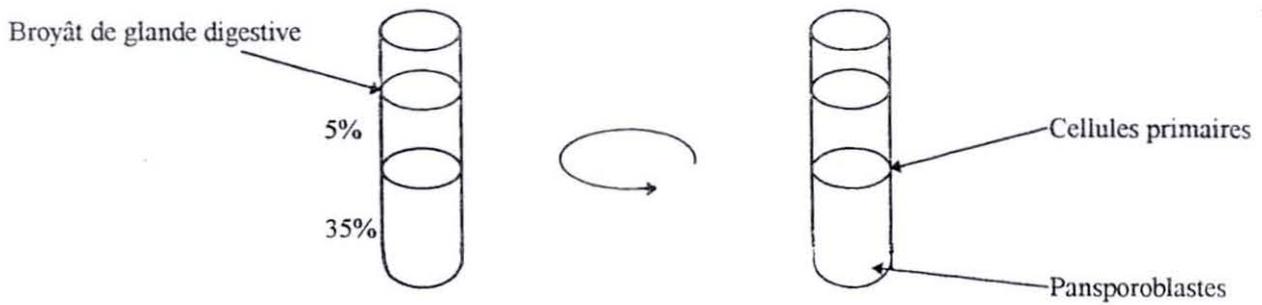


Figure 7 : Centrifugation isopycnique en gradient de saccharose. Les pansporoblastes sont présents avec de nombreuses autres impuretés (cellules hôtes, algues, bactéries). Grossissement : x1000 . p : pansporoblaste ; i : impureté.



Figure 8 : Observation au microscope à épifluorescence des pansporoblastes colorés au DAPI après centrifugation isopycnique. Grossissement : x100. p : pansporoblaste ; c : cellule non parasitaire.

Cette première étape a pour but d'extraire les pansporoblaste de l'épithélium de la glande digestive où elles sont insérées. Ils sont concentrés après centrifugation mais il faut encore les séparer des algues et autres cellules contaminantes. Pour cela deux techniques différentes de purification ont été réalisées parallèlement : une méthode par gradient de Percoll et la deuxième par chromatographie d'affinité.

2-2 Purification de *Marteilia* par gradient de Percoll

Les culots sont récupérés et resuspendus, dans un faible volume d'EMFT et sont réunis en vue d'une deuxième centrifugation sur gradient discontinu 10%, 20%, 30%, 40% de Percoll (Pharmacia®) en EMFT (2500g, 30 min.).

La fraction entière de 20% ainsi que l'interface 20/30 sont récupérées, car elles contiennent les pansporoblastes. Après avoir dilué de moitié avec de l'EMFT, l'ensemble des cellules est culotté 15 min./ 2500g à 4°C.

Les culots récupérés sont resuspendus avant d'être déposés sur une dernière fraction de Percoll de 25% en EMFT. Les parasites sont à nouveau centrifugés deux fois (15 min., 2500g) de manière à obtenir une population cellulaire homogène.

2 -3 Purification de *Marteilia* par chromatographie d'affinité:

Le principe réside dans la séparation, à partir d'une population de cellules hétérogènes (bactéries, protistes, algues), de cellules contre lesquelles un anticorps de souris est dirigé. Ce dernier est ensuite reconnu par un anticorps anti-anticorps de souris couplé à des microbilles métalliques. Soumises à un champs magnétique appliqué par un aimant sur une colonne, ayant comme phase stationnaire une matrice métallique, les microbilles restent prisonnières de cette dernière. Elles fixent ainsi indirectement les cellules reconnues par l'anticorps primaire, tandis que les cellules indésirables sont évacuées avec la phase mobile. Les cellules recherchées sont ensuite éluées en sortant la colonne du champ magnétique (figure 9). La chromatographie a été

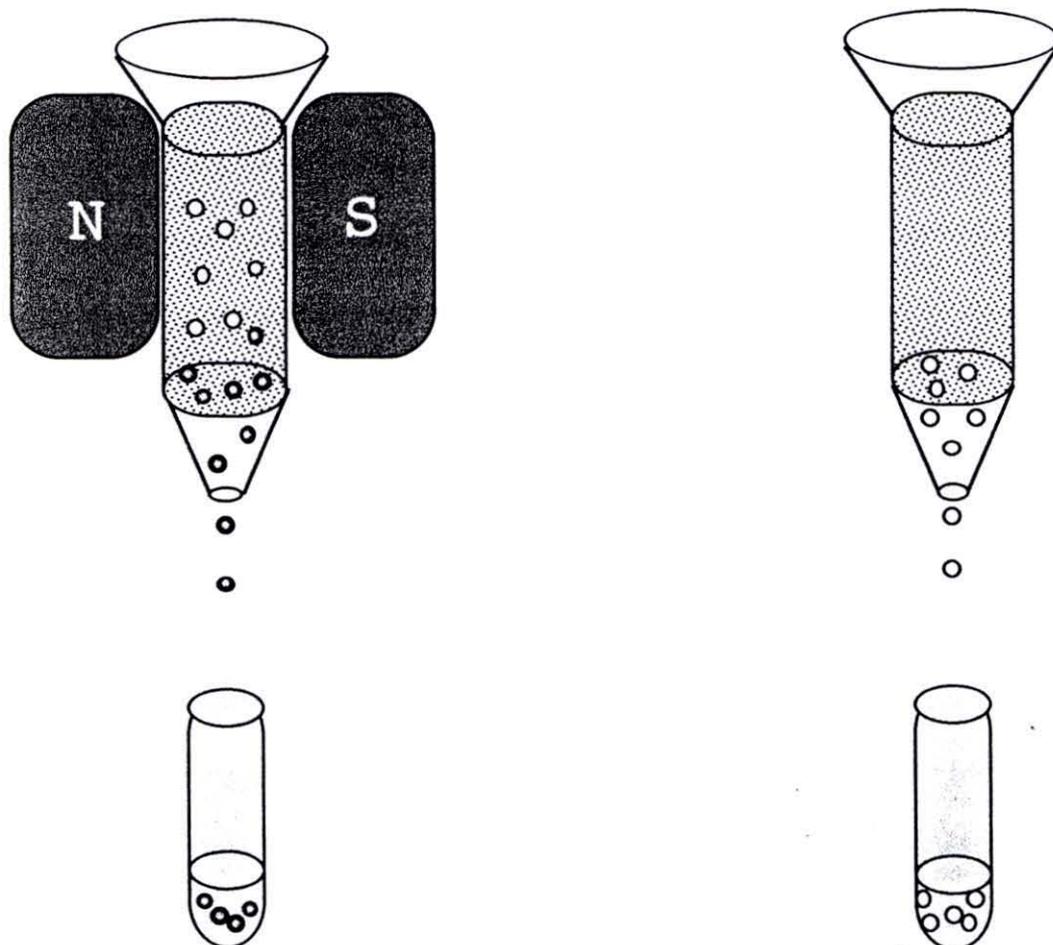


Figure 9 : Principe de la chromatographie d'affinité. La colonne soumise à un champ magnétique important entre les pôles d'un aimant, emprisonne par l'intermédiaire de sa phase stationnaire métallique toute particule susceptible d'être couplée à des microbilles métalliques. Les autres particules sont éluées. Ce n'est qu'en dehors du champ magnétique que ces particules couplées aux microbilles seront récupérées.

menée selon les recommandations du kit MiniMacs Starting Kit[®] de Miltenyi Biotec, contenant les anticorps de chèvre anti-anticorps de souris couplés aux billes métalliques.

Les culots obtenus par centrifugation en gradient de sucrose sont repris dans du PBS et collectés dans un seul tube pour être centrifugés (2500g, 15min.). De nouveaux, les culots obtenus sont resuspendus et centrifugés en PBS à 2500g pendant 15min..

Les cellules ainsi purifiées sont comptées sur cellule de Malassez de telle sorte à prelever 10 à 15 millions de ces dernières pour la chromatographie d'affinité. Les cellules sont ensuite diluées dans 15ml de PBS pour une dernière centrifugation à 2500g, pendant 15min. en PBS .

Les culots obtenus sont resuspendus dans le surnageant d'hybridome contenant un anticorps de souris, appelé 4-1-1 et réalisée par Robledo *et al* (1994). Cet anticorps monoclonal est spécifique du stade pansporoblaste. Les cellules sont donc incubées une heure à température ambiante en présence de l'anticorps primaire .

Après centrifugation (2500g, 15min.) les cellules sont lavées trois fois en PBS par centrifugation. Le culot obtenu est repris dans du PBS contenant l'anticorps secondaire couplé aux billes magnétiques. Les cellules sont incubées pendant 30min. en présence de l'anticorps secondaire de chèvre anti-anticorps de souris.

Après dépôt des cellules sur la colonne trois lavages de 5ml sont effectués en PBS . Les cellules sont récupérées par élution en PBS en dehors de l'aimant pour être récupérées dans un volume final de 1ml. Les cellules sont centrifugées pendant 1 min. à 5000g avant l'extraction d'ADN.

II Isolement des séquences nucléiques

1 Extraction de l'ADN génomique

Les cellules centrifugées sont resuspendues et incubées à 37°C toute la nuit dans 400µl de tampon d'extraction (Tris 2,5mM, EDTA 0,05mM, NaCl 2mM, SDS 10%) supplémenté en protéinase K (10mg.ml⁻¹). Après lyse cellulaire, l'ADN est extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). La phase aqueuse est précipitée par 2 volumes d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M, pH 4,8) puis le culot d'ADN obtenu est lavé à l'éthanol 70% (10min., 20000g) avant d'être resuspendu dans de l'eau distillée et traitée à la RNase A de concentration finale 0,01mg.ml⁻¹, 1h à 37°C.

2 SSP PCR

2.1 Principe

Cette technique mise au point par (Shyamala et Ames, 1993) est utilisée pour isoler par PCR un segment d'ADN adjacent à une séquence connue. Elle consiste à réaliser les premières étapes de la construction d'une banque génomique, mais suite à la ligation il n'y pas de transformation de bactéries. Le produit de ligation (dilué au 1/10), est utilisé pour isoler par PCR un segment d'ADN adjacent à une séquence connue. En effet l'utilisation d'une amorce spécifique de la séquence connue et d'une amorce spécifique (U ou R) du site multiple de clonage du vecteur plasmidique pBluescript®II permet de cloner rapidement des fragments recherchés sans avoir à réaliser le criblage fastidieux d'une banque génomique (figure 10).

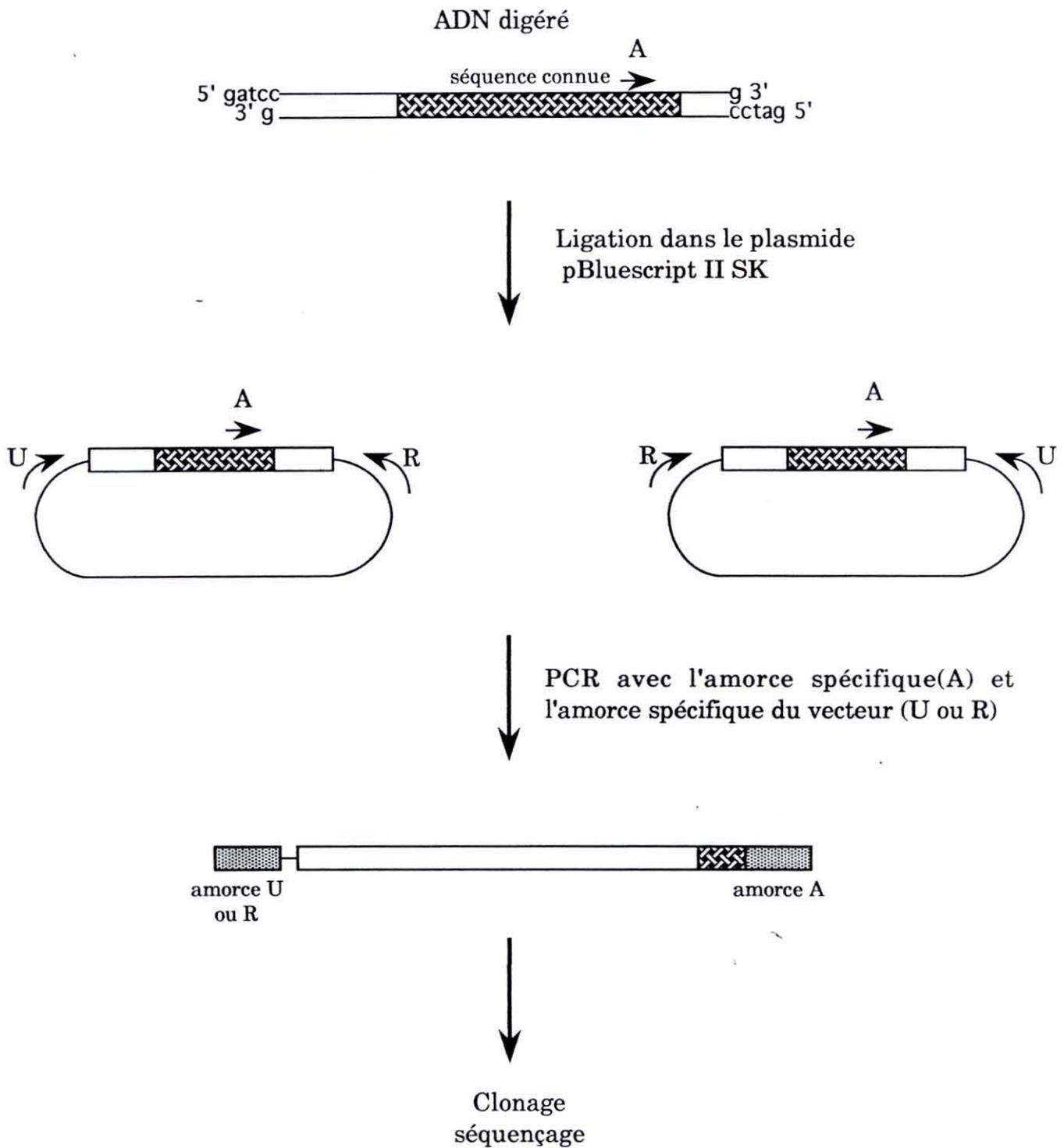


Figure 10 : Principe de la SSP-PCR.

2.2 Digestion enzymatique

L'ADN génomique (1µg) a été digéré par cinq enzymes différentes: dans un volume final de 100µl avec une concentration en enzyme de 0,5U/µl. pendant 1heure à 37°C. De la même façon, 10µg de vecteur plasmidique pBluescript®II SK (figure 11), ont été digéré dans un volume final de 50µl pendant une heure à 37°C, avec une concentration d'enzyme de 0,25U/µl.

2.3 Extraction de l'ADN digéré

Les ADN digérés sont extraits par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). La phase aqueuse est récupérée pour être précipitée à l'éthanol absolu, puis lavée à l'éthanol 70% avant que les culots obtenus ne soient séchés sous vide.

2.4 Déphosphorylation

Les vecteurs linéarisés sont repris dans de l'eau distillée stérile et déphosphorylés à l'aide de la phosphatase alcaline bovine (CIP) à une concentration de 0,5U/µl dans un volume final de 20µl, dans le tampon Tris 100mM pH 8,3, MgCl₂ 10mM. La réaction de déphosphorylation est réalisée à 37°C pendant une heure avant d'extraire les plasmides déphosphorylés comme précédemment.

2.5 Ligature

Les vecteurs déphosphorylés (1µg) ont été coprecipités avec l'ADN génomique digéré, avant d'être resuspendu dans un volume final de 10µl contenant 6 unités de T4 DNA ligase (Pharmacia Biotec), et le tampon de réaction Tris 50mM (pH 7,6), MgCl₂ 10mM, 2,5mM DTT, et 1mM d'ATP. Les réactions de ligature sont incubées toute la nuit à 16°C.

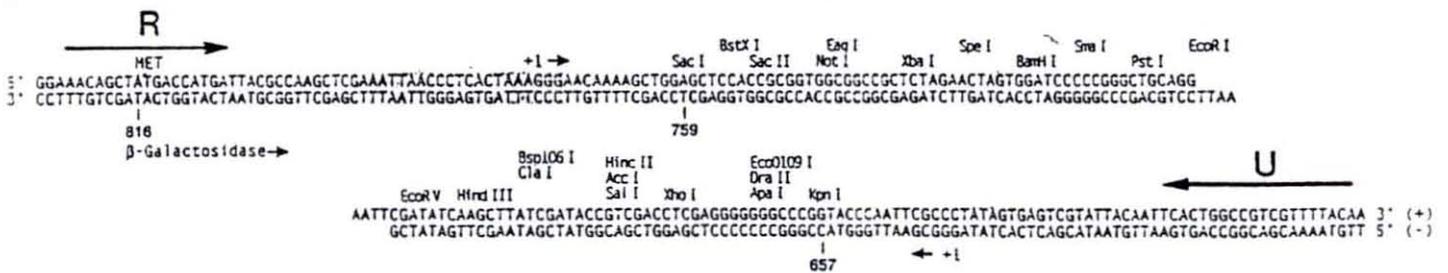
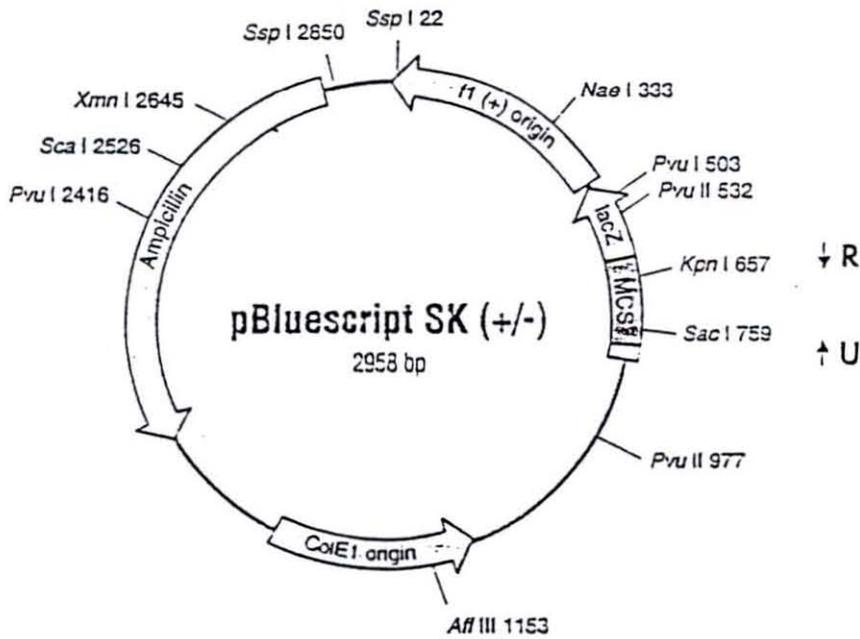


Figure 11 : Carte de restriction du plasmide pBluescript SK. Les amorces U et R sont localisées aux deux extrémités du site de clonage multiple (MCS). Ampicillin : gène de résistance à l'ampicilline ; ColE1 : origine de réplcation du plasmide. f1 origin : origine de réplcation d'un phage, permettant de récupérer le brin sens du gène lacZ (gène de la β-galactosidase) ; R : AACAGCTATGACCATGA ; U : GTAAAACGACGGCCAGTG.

3 Amplification

Toutes les réactions de PCR ont été réalisées avec l'enzyme Goldstar™ "Red" Taq polymérase d'Eurogentec. La concentration de MgCl₂ est ajustée à 2,5mM, la concentration des quatre nucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) est ajustée à 2μM, et celle des amorces à 1μM. Chaque réaction est réalisée avec 1ng d'ADN, une concentration de Taq de 0,02 U/μl, dans un volume réactionnel de 50μl.

Les conditions de la PCR (temps et températures) sont standard:

| | |
|-----------|----------------|
| | 4 min. à 94°C |
| 35 Cycles | 1 min. à 94°C |
| | 1 min. à 50°C |
| | 1 min. à 72°C |
| | 20 min. à 72°C |

4 Electroélution

Les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 1%, TBE 0,5X, puis après migration d'une heure à 90V en tampon TBE 0,5X, ils sont révélés au bromure d'éthidium (10mg/ml) et observés sous une lampe UV. Les bandes obtenues sont coupées et électroéluées du bloc d'agarose en tampon TBE 0,5X pendant 1 heure à 100V. Les produits électroélués sont ensuite précipités par 2 volumes d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 pendant 15 min. à 20000g. Les culots sont lavés à l'éthanol 70% (10 min., 20000g) puis séchés sous vide pour être resuspendu dans 7μl d'eau distillée stérile.

3 Amplification

Toutes les réactions de PCR ont été réalisées avec l'enzyme Goldstar™ "Red" Taq polymérase d'Eurogentec. La concentration de MgCl₂ est ajustée à 2,5mM, la concentration des quatre nucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) est ajustée à 2μM, et celle des amorces à 1μM. Chaque réaction est réalisée avec 1ng d'ADN, une concentration de Taq de 0,02 U/μl, dans un volume réactionnel de 50μl.

Les conditions de la PCR (temps et températures) sont standard:

| | |
|------------------|----------------|
| | 4 min. à 94°C |
| 35 Cycles | 1 min. à 94°C |
| | 1 min. à 50°C |
| | 1 min. à 72°C |
| | 20 min. à 72°C |

4 Electroélution

Les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 1%, TBE 0,5X, puis après migration d'une heure à 90V en tampon TBE 0,5X, ils sont révélés au bromure d'éthidium (10mg/ml) et observés sous une lampe UV. Les bandes obtenues sont coupées et électroéluées du bloc d'agarose en tampon TBE 0,5X pendant 1 heure à 100V. Les produits électroélués sont ensuite précipités par 2 volumes d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 pendant 15 min. à 20000g. Les culots sont lavés à l'éthanol 70% (10 min., 20000g) puis séchés sous vide pour être resuspendu dans 7μl d'eau distillée stérile.

5 Clonage des fragments amplifiés

Les fragments d'ADN sont clonés dans le vecteur plasmidique pGEM-T Easy[®] (figure 12) en présence de la T4 DNA Ligase selon les recommandations du Kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega) : 12h à 4°C. Le produit de ligature est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* (XL1Blue) selon le protocole décrit par Hanahan (Sambrook *et al.* 1989). Les bactéries sont sélectionnées sur milieu LB/Agar 1,5%, contenant 100µg.ml⁻¹ d'ampicilline, 100mM d'IPTG et 40µg.ml⁻¹ de X-Gal. Après une incubation de 12h à 37°C, les colonies blanches ont été repiquées et ensemencées dans 2ml de milieu LB supplémenté en ampicilline.

6 Extraction plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée par la méthode de lyse alcaline. Après centrifugation (3500g, 2 min., 4°C), les cellules sont resuspendues dans 100µl d'une solution de Tris 25mM, EDTA 10mM, pH 8,0 et incubées 5min. dans la glace. Puis, 200µl d'une solution de NaOH 0,2 M/SDS 1%, sont ajoutés ainsi que 150µl d'acétate de sodium 3M pH 4,8. Après centrifugation (10min., 20000g), 400µl du surnageant sont ajoutés à 1 ml d'éthanol absolu avant de subir une deuxième centrifugation (10 min., 20000g, 4°C). Le culot est repris dans 100µl de Tris 25mM, EDTA 10mM, pH 7,6, contenant de la RNase A à 0,01mg.ml⁻¹ et incubé à 65°C pendant 10 min. Puis 200µl d'éthanol absolu sont ajoutés avant centrifugation (10 min, 20000 g , 4°C). Le culot est séché sous vide puis repris dans 50 µl d'eau distillée.

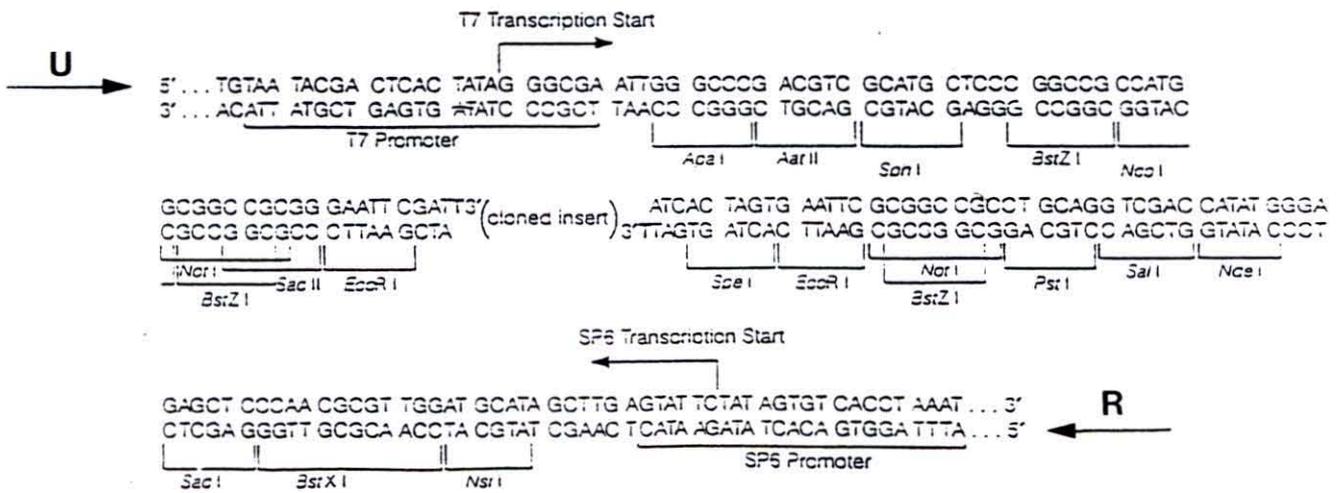
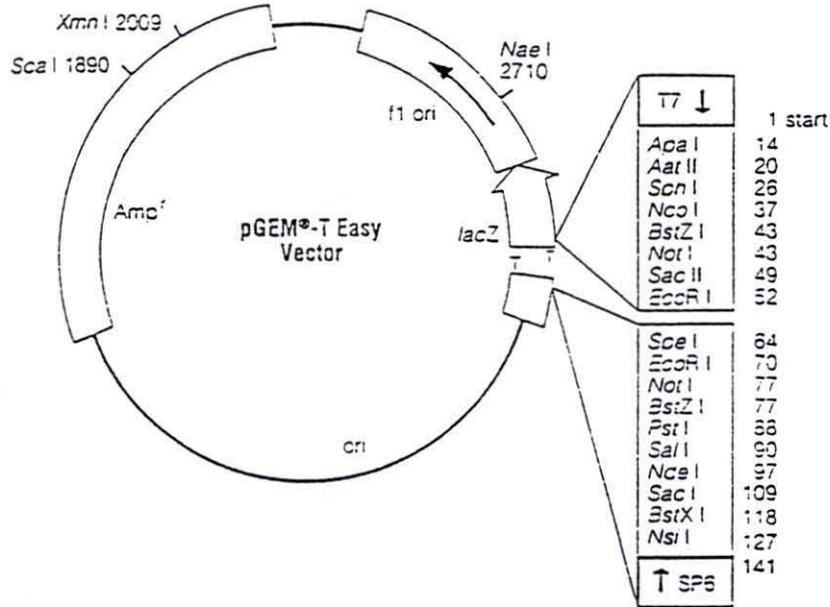


Figure 12 : Carte de restriction du plasmide pGEM[®]-T EASY Vector. Les amorces U et R sont situées en dehors du site de clonage multiple.

7 Digestion des clones recombinants

Pour cela 1µg de chaque plasmide est digéré par 2,5U d'*EcoRI*, dans un volume final de 10µl. Ces digestions sont ensuite analysées sur un gel d'agarose 1%, TBE 0,5X après migration d'une heure en tampon TBE 0,5X.

8 Séquençage

Le séquençage des différents plasmides recombinant à été réalisé avec les amorces universelles, situés sur le plasmide, selon le principe décrit par Sanger *et al* (1977). Les réactions de séquence, ont été réalisées avec le Kit ABI Prism[®] Dye terminator Cycle Sequencing (Perkin-Elmer), utilisé selon les recommandations du fabricant, sur l'appareil Gene Amp[®] PCR system 2400 (Perkin-Elmer). Les réactions ont été lues et analysées après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (4,25%) sur un séquenceur automatique ABI Prism[®] 377 de Perkin Elmer. Le traitement des séquences a été réalisé à l'aide du programme Staden du serveur Infobiogen. Les séquences obtenues sont comparées à celles présentes dans Genbank, grâce à l'algorithme Blastn.

RESULTATS

DISCUSSION

RESULTATS-DISCUSSION

1 Purification de *Marteilia*

1.1 Isolement par immunoaffinité

Les cellules de *Marteilia* obtenues sont au nombre de 6 à $13 \cdot 10^6$ par chromatographie, elles constituent une quantité relativement faible de matériel biologique pour des expériences nécessitant des quantités plus importantes. Néanmoins, pour l'amplification enzymatique d'ADN (PCR), pour laquelle la présence de quantités infimes d'ADN est suffisante, cette technique de purification s'avère particulièrement intéressante.

En effet, si l'on considère la puissance de la technique PCR, et le fait que nous utilisons des amorces universelles, il est nécessaire d'exclure les cellules autres que celles recherchées. L'observation des pansporoblastes obtenus montre une très bonne homogénéité de la population cellulaire.

1.2 Purification par centrifugation en gradient de Percoll

Dans ce cas, la quantité de cellules obtenues peut varier de 50 à $80 \cdot 10^6$ parasites, en fonction du taux de parasitisme de chaque mollusque infesté. L'observation au DAPI montre l'absence de cellules étrangères aux parasites. Cette méthode permet donc d'obtenir des quantités très importantes de parasites, d'une pureté très satisfaisante, utilisables pour toutes les applications de la PCR et toute autre technique de Biologie Moléculaire.

2 Amplification des séquences nucléiques d'intérêt

2.1 Problème rencontré avec l'ADN extrait après gradient de Percoll

Malgré les essais réalisés avec les différentes amorces universelles (figure 13) permettant d'amplifier le gene codant l'ARN 18S (Medlin *et al.*, 1988) ou les ITS (Bachellerie et Liang-Hu Qu, 1993), aucun fragment n'a pu être obtenu par PCR à partir de l'ADN provenant des cellules purifiées par gradient de Percoll. Ceci peut être dû à la présence d'un composé chimique inhibant la *Taq* polymérase. Par contre, l'ADN extrait des cellules purifiées par chromatographie d'affinité, a permis de réaliser toutes les amplifications souhaitées.

2.2 Amplification des séquences contenant l'ARN 18S

L'amplification a été réalisée avec une température d'hybridation de 50°C. Ceci nous a permis d'obtenir, à partir de l'ADN extrait de *Marteilia* provenant de moule (*M. edulis*) et d'huître plate (*O. edulis*), un amplicon de 1800pb (figure 14). Ces deux fragments ont été clonés puis séquencés.

2.3 Isolement des ITS de *Marteilia* provenant de *M. edulis*

Pour des raisons pratiques (abondance de mollusques parasités), les expériences décrites ci dessous n'ont été conduites que sur les parasites extraits de moule. En effet, l'extraction des parasites nécessitant le sacrifice des animaux parasités, il est plus intéressant de travailler sur *M. edulis*, espèce loin d'être mise en péril par la marteiliose, qui de surcroît est prolifique et présente un taux de parasitisme équivalent à celui de l'huître plate.

Quatre amorces ont été nécessaires pour isoler les deux ITS et la séquence correspondant à l'ARN 5,8S de *Marteilia* provenant de *M. edulis*. Une première PCR réalisée avec les amorces MaC et MaF (température d'hybridation de 44°C) a permis d'obtenir un fragment d'environ 1000pb. Pour s'assurer que ce fragment contient bien les séquences recherchées, deux réactions de PCR ont été réalisées dans les mêmes conditions, avec les

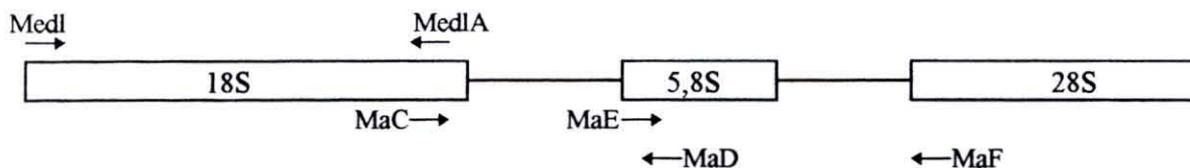


Figure 13 : Position et séquence des amorces universelles. Ces amorces sont toutes dessinées dans les zones très conservées chez les eucaryotes.

MedI : CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT
 MedIA : CCCGGGATCCAAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC
 MaC : CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
 MaD : TCCTGCAATTCACATTAATTCTCGCAGCTAGC
 MaE : GTCGATGAAGAACGCAG
 MaF : GAATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCT



Figure 14: Amplification à l'aide d'amorces universelles. Les produits PCR font 1800 pb dans le cas du gène contenant la séquence de l'ARN 18S de *Marteilia* d'huître (1). et de moule (2). Les espaces intertranscriptionnels amplifiés à partir d'ADN de *Marteilia* de moule sont respectivement pour l'ITS₁ (3) et l'ITS₂ (4) de 470 et 580pb.

couples d'amorces MaC/MaD et MaE/MaF, a partir d'une petite quantité du produit PCR précédent. La taille des amplicons est de 470pb pour le couple MaC/MaD et 580pb pour le couple MaE/MaF (figure 14). La somme de ces deux derniers fragments, correspondant à celle due à l'utilisation du couple MaC/MaF, laisse supposer que seul l'ensemble l'ITS₁-ARN 5,8S-l'ITS₂ a été obtenu. Le séquençage, après clonage, en a apporté la confirmation.

3 Séquençage et comparaison des séquences

3.1 Contamination par l'ADN de l'hôte

Le séquençage des clones contenant l'ARN 18S et la comparaison des séquences, grâce à l'algorithme Blastn, par rapport aux séquences répertoriées dans Genbank montrent qu'il y a 99% d'homologies avec les séquences des hôtes du parasite. Ces résultats sont obtenus pour les parasites extraits de moule ainsi que pour ceux isolés chez les huîtres plates. Les parasites provenant d'espèces hôtes différentes ont en commun le fait d'avoir été isolé par le même protocole. De ce fait, il apparaît clairement, que la méthode de purification par chromatographie d'affinité n'est pas capable de prévenir une contamination par de l'ADN des hôtes.

Le fait de broyer la glande digestive entraîne l'éclatement de million de cellules. Il apparaît évident qu'une quantité considérable d'ADN se retrouve dans la solution de broyage. Etant donné les résultats, la quantité doit être telle que les différents lavages réalisés lors de la chromatographie ne sont pas totalement efficaces pour éliminer l'ADN de l'hôte.

De plus, il est probable que les amorces universelles ont plus d'affinité pour l'huître ou la moule, que pour *Marteilia*. En effet, il faut préciser que dans toutes les réactions de PCR les quantités d'ADN de *Marteilia* sont bien supérieures à celles de l'hôte. Il serait donc normal d'attendre une amplification des deux ADN et donc d'obtenir un profil complexe (présence de

plusieurs bandes) sur gel après les réactions de PCR. Or, cela n'est pas observé. Il se pourrait alors que les amorces universelles employées par Medlin *et al.* (1988) ne s'hybrident pas à l'ADN de *Marteilia*. Cela expliquerait le fait que l'on soit incapable d'amplifier ces mêmes fragments après les gradients de Percoll, du fait que l'ADN extrait des parasites provenant des purifications par gradient de Percoll serait exempt d'ADN contaminant.

3.2 Isolement des ITS de *M. edulis*

Le séquençage montre que le bloc ITS₁, ARN 5,8S, ITS₂ fait 901 pb, avec un ITS₁ de 363 pb, un ARN 5,8S de 163 pb et un ITS₂ de 375 pb (figure 15). La recherche dans les banques de données a révélé que ces fragments n'avaient jamais été isolés. Nous sommes donc devant des séquences inédites. Toutefois, la suspicion que les ITS isolés proviennent de la moule (*M. edulis*) était grande, et a été confirmée par PCR sur ADN de moule exempte de parasites. En effet, les amorces utilisées précédemment ont permis d'amplifier des fragments identiques à ceux isolés du parasite. De plus, l'utilisation d'amorces spécifiques (Imma et Immd) synthétisées à partir des deux ITS a permis d'amplifier un fragment d'une taille attendue de 450pb, confirmant ainsi cette contamination.

4 SSP PCR

4.1 Test des amorces universelles

Le matériel nucléique utilisé pour ces approches correspond à celui qui est extrait de *Marteilia* de moules purifiés par gradient de Percoll. Ce dernier est présumé dépourvu d'ADN contaminant.

Les réactions d'amplification réalisées avec une des amorces universelles, situé à l'extrémité du gène codant pour l'ARN 18S, et les amorces U et R n'ont pas permis d'obtenir un seul amplicon. Par contre, l'utilisation de l'amorce située à l'autre extrémité de ce même gène, a permis d'obtenir un fragment de 100pb.

| | | | | | | | |
|------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | |
| | CGTAGGTGAA | CCTGCAGAAG | GATCATTACC | GCTATCGATC | AGATTTATAT | ACCTTTTCAT | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| | CGGGGTTATA | TTTCTATCTA | GCTTATCGTA | CGCAAAAAAA | CATCGGTCAC | CTTCGGTGAT | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| | CGATATCAAA | AGTCCCCGTG | GTCTGCGGTC | TCGGTCGCAG | ATCGGCGGGG | TGGGTGCAAG | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| | TTGACAGGTA | CACGGGTTTT | TGCCCCTTTC | AACGGGGGTA | <u>AGGCTCGTTA</u> | <u>CCGGCCTGCT</u> | ImmA |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| | TACCTTCCTC | CATGCTATTT | TTATTTTTTCT | TTCACTCGAA | CGTCAATGAA | AAACAAAGCA | |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | |
| | TAACACGCAG | GTCGCCCCGT | CGTTACAAAC | ATTTTCGTTG | CCAGACGACG | GGGCTTCCGA | |
| | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | |
| | CACTTTTGGC | ACACGCCAAG | AACAAAACAT | <u>ATGAAAATA</u> | <u>CTCTAGGCGG</u> | <u>TGGATCACTC</u> | |
| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | |
| | GGCTCGTGCG | TCGATGAAGA | ACGCAGCCAG | CTGCGTGAAT | TAATGTGAAT | TGCAGGACAC | |
| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | |
| | ATTGAACATC | GACATCTTGA | ACGCACATTG | CGGCTTTGGG | TCACTCCCGG | AGCCACGCCT | |
| | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | |
| | GTCTGAGGGT | CGGTGAAACA | TCAATCGCAC | CGAACGGGTT | CACGCCCGCT | TTGGCTGCGC | |
| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | |
| | CTTGGGCTTT | TGTCGCAGCG | GATCGTTTAC | GGTACGCTTC | GTCGCCTTAA | <u>ATGCAGACCC</u> | |
| | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 | |
| ImmD | <u>ATGTCGTCTC</u> | <u>GC</u> TTTGCCTT | TCGGTACTTG | TATTCTTAAT | TTCTCCGCCG | CCGTACGGCT | |
| | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | |
| | GTGGAGGGGA | CGCACGCCTG | GGAATTTTCT | TAATCGAAAT | ATCTCGCGCT | CCTCTCCCGA | |
| | 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 | |
| | TCAAAAGCCG | AACGGTGCCT | GGGAGCAAGG | CAAGATGCAC | AGGAAGAAAG | GGCCCATGCA | |
| | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 | |
| | AGGAGCGTGC | GGGGGGCGAC | GGGTGCACGA | TGGATTCCCG | CTCGGCTTCT | CTTCGTCTCTC | |
| | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | |
| | TGTGCGTCTG | CAGGGTGTGT | GTGTGTTGTG | TGTTTTTTGC | GTCCTCTGTT | CGGCCTCGGG | |
| | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | |
| | <u>TCCGCGGTGA</u> | <u>GTTTCCGCTT</u> | <u>ATTTTTAGGC</u> | <u>TGTGGCTAAG</u> | <u>CGGCTGACCA</u> | <u>GGATTTAACC</u> | |
| | 1027 | | | | | | |
| | <u>AGGATTC</u> | | | | | | |

Figure 15 : Séquence du bloc ITS_{1-5,8S}-ITS₂. Les séquences soulignées correspondent aux séquences d'ADNr. Les amorces ImmA et ImmD sont indiquées. Elles permettent l'amplification d'un fragment de 450 pb. ImmA : GGTAAGGCTCGTTACCGGCCTGC ; ImmD : GCGAGACGACATGGGTCTGC.

Ce fragment a été cloné puis séquencé. Il apparaît que ce clone (appelé R10.8) contient une séquence de 100 pb correspondant à une extrémité du gène codant pour l'ARN 18S. Or, la comparaison, grâce à l'algorithme blastn, avec les séquences stockées dans Genbank, montre qu'il n'y a pas de correspondance avec celles de l'hôte. Il semble donc qu'une des deux amorces universelles ne s'hybride pas à l'ADN de *Marteilia*. Cela explique donc le fait que ce couple d'amorces universelles n'a pas permis d'amplifier le gène recherché.

4.2 Amplification et isolement de clones supplémentaires

Un autre fragment de 300 pb provenant de la digestion par ApaI a pu être amplifié. Ce dernier a été cloné (Or12) puis séquencé. Il contient les séquences retrouvées dans le clone R-10.8, ainsi que des séquences supplémentaires correspondant à de l'ADNr. Un contig de 244 pb a donc pu être réalisé.

CONCLUSION

Conclusion

Dans le but d'isoler par PCR le gène codant pour l'ARN 18S du genre *Marteilia*, deux protocoles de purification ont été testés afin d'éviter toute forme de contamination. Mais le fait de modifier le protocole de purification déjà existant, en substituant les étapes de centrifugation en gradient de Percoll par une étape de chromatographie d'affinité n'a pas permis d'éviter la contamination par l'ADN de l'hôte. Comme la technique de purification par gradient de Percoll comporte un avantage quantitatif, par le nombre important de cellules purifiées, et qualitatif par l'absence d'ADN contaminant, la purification par immunoaffinité a été abandonnée.

Le travail de purification réalisé selon les protocoles établis avec les étapes au Percoll n'a pas permis d'amplifier le gène contenant la séquence de ARNr 18S avec les amorces universelles utilisées.

Il est probable que le même phénomène se produise avec les amorces universelles servant à isoler les ITS. En effet, ces couples d'amorces n'ont conduit qu'à l'amplification des ITS provenant de *M. edulis*. Ceci suggère que parmi ces couples d'amorces, plusieurs d'entre elles ne sont pas assez spécifiques de *Marteilia*.

Alors que la stratégie classique par PCR était mise en échec, l'approche par SSP-PCR a permis d'obtenir 2 clones dont l'assemblage forme un contig de 244pb. Ce dernier contient une extrémité du gène codant pour l'ARN 18S de *Marteilia sp.*, et sert à l'heure actuelle de tremplin pour l'isolement du gène complet.

Les premières séquences, une fois établies chez *Marteilia sp.*, seront très utiles pour isoler les séquences de *M. refringens* et de *M. maurini* afin de préciser leur relation à l'intérieur du genre *Marteilia*, car il reste encore à déterminer si les *Marteilia* isolés chez *M. edulis* sont des espèces différentes ou identiques à *M. refringens*. Les séquences des autres

parasites composant le genre *Marteilia* pourront être étudiés de la même façon, afin de préciser leurs relations systématiques et la position phylogénétique par rapport aux autres protistes.

En parallèle, d'autres gènes conservés comme ceux d'actine, de tubuline, ou de cytochrome c, pourraient être isolés par PCR, dans le but de corroborer les informations qui seraient susceptibles d'être obtenues à partir du gène codant l'ARN 18S.

De plus, ces séquences seront des outils précieux lors de la recherche d'un hôte intermédiaire éventuel de *M. refringens*. En effet, la comparaison des séquences des formes parasitaires qui pourraient être découvertes dans un organisme, devrait faciliter l'identification du parasite et donc la caractérisation de l'hôte intermédiaire. Ceci, à long terme, assurerait la possibilité de la mise en place d'une politique d'éradication de *M. refringens* permettant ainsi la relance de l'industrie de l'huître plate.

ANNEXE

ANNEXE

Solutions et tampons :

TBE 10X pH 8,8

Tris base..... 108g
acide borique.....55g
EDTA.....7,45g
H₂O.....qsp 100ml

Milieu LB

NaCl.....10g
tryptone.....10g
extrait de levure.....5g
H₂O.....qsp 1000ml
pH ajusté à 7

LB agar

agar.....15g

PBS 1X pH 7,4

NaCl.....8g
KCl.....0,2g
NaH₂PO₄.....1,44g
KH₂PO₄.....0,24g
H₂O.....qsp 1000ml

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Bachellerie, J.P., Liang-Hu, Q. Methods in Molecular Biology, edited by John Hyde, Humana press Inc., Totowa, NJ. 1993. Vol. 21 : Protocols in Molecular Parasitology, 249-263.
- Balouet, G., Chastel, C., Cahour, A., Quillard, A., Poder, M. (1979). Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. Science et Pêche, 289 : 13-23.
- Bougrier, S., Tigé, G., Bachère, E., Grizel, H. (1986). *Ostrea angasi*. An acclimatation to French Coasts. Aquaculture, 58 : 151-154.
- Cahours, A. (1979). *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. Mar. Fish. Rev., 41 : 19-20.
- Comps, M. (1970). Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. Rev. Trav. Inst. Pêches Mar., 34 : 317-326.
- Comps, M., Grizel, H., Tigé, G., Duthoit, J.L. (1975) Parasites nouveaux de la glande digestive des Mollusques marins *Mytilus edulis* et *Cardium edule*. C. R. Acad. Sc Paris Série D, t. 281 : 179-181.
- Comps, M. (1976), *Marteilia lengehi* n.sp., parasite de l'huître *Crassostrea cuculata* Born. Rev. Trav. Inst. Pêches Mar., 40 : 347-349.
- Comps, M. (1979). Etude du cycle de *Marteilia refringens* dans l'étang de Thau. Comm. C.I.E.M. C.M./ F : 19.
- Comps, M., Joly, J.P. (1980). Contamination expérimentale de *Mytilus galloprovincialis* LMK par *Marteilia refringens*. Science et Pêche, 301 : 19-21.
- Comps, M., Pichot, Y., Papayanni, P. (1982). Recherches sur *Marteilia maurini* n.sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Rev. Trav. Inst. Pêches Mar., 45 : 211-214.
- Comps, M. (1985). Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp.N. parasite du Lavignon, *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélecypode). Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 47 : 99-104.
- Desportes, I., Ginsburger-Vogel, T. (1977). Affinités du genre *Marteilia*, parasites d'huîtres (maladie des Abers) et du crustacé *Orchestia gammarellus* (Pallas), avec les Myxosporidies, les Actinomyxidies et Paramyxidies. C. R. Acad. Sc Paris Série D, t. 285 : 1111-1114.
- Desportes, I., Lom, J. (1981). Affinités de *Poecilochaetus serpens* (Annélide Polychète) avec les *Marteiliidae* Sprague, parasites d'huîtres et du Crustacé *Orchestia gammarellus*. C. R. Acad. Sc Paris Série D, t. 292 : 627-632.
- Desportes, I., Perkins, F.O. (1991). Phylum Paramyxia. In : L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian, and D.J. Chapman (eds.). Handbook of Protista. Boston : Jones and Bartlett Publisher, pp. 30-35.

- Figueras, A. J., Jardon, C. F., Caldas, J.R. (1991). Diseases and parasites of rafted Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) : preliminary results. *Aquaculture* 99 : 17-33.
- Franc, A.(1980). Sur quelques aspect inédits du cycle de *Marteilia refringens* Grizel et col. 1974, parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Cahiers de Biologie marine*, 21,99-106.
- 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. *Science et pêche*, 240 : 7-29.
- Grizel, H., Tige, G. (1974). Extension de la maladie de la glande digestive de l'huître plate en Bretagne. *Cons. Int. Explor. Mer.*, C. M. K 37 : 1-3.
- Grizel, H., Tige, G., Raboin, M.A. (1976). Données sur la situation de la maladie de l'huître plate *Ostrea edulis* Linne. *Cons. Int. Explor. Mer*, C. M. K. 18 : 1-7.
- Grizel, H., Comps, M., Raguennes, D., Le Borgne, Y., Tigé, G., Martin, A.G. (1983). Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les cotes de Bretagne. *Revue Trav. Inst. Pêches. marit.*,40 : 209-225.
- Herrbach, B.(1971). Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linne. *Revue des travaux de l'institut des pêches Maritimes*, 35 : 79-87.
- Marteil, L. : La conchyliculture française. Edit. : Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes. 1976.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S. and Sogin, M.L.(1988). The characterisation of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71 :491-499.
- Ormières, R., Sprague, V., Bartoli, P. (1973). Light and electron microscope study of a new species of Urosporidium (Haplosporida), hyperparasites of Trematode sporocysts in the clam *Abra ovata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 21, 71-86.
- Perkins, F.O., Wolf, P.H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. Haplosporidan pathogen of Australian oysters. *Journal of Parasitology*, 62 : 528-538.
- Perkins, F.O. (1976). Ultrastructure of sporulation in the european flat oyster pathogen, *Marteilia refringens*- Taxonomic implication. *Journal of Protozoology*, 23 : 64-74.
- Poder, M., Auffret, M., Balouet, G. (1983). Etudes pathologiques et épidémiologiques des lésions parasitaires chez *Ostrea edulis* L. Premiers résultats d'une recherche prospective comparative chez les principales espèces de mollusques des zones ostreicoles de Bretagne Nord. Bases biologiques de l'aquaculture. Montpellier, IFREMER, Actes de colloques n°1, 125-138.
- Poder, M. et Auffret, M.(1983). Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les cotes de Bretagne Nord. *Rev. Inst. Pêches Marit.*, 47 : 105-109

Robledo, J.A.F., Caceres-Martinez, J., Figueras, A.J. (1994). *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK.) from Galicia, Spain. The Journal of Parasitology, 81 : 354-363.

Robledo, J.A.F, Boulo, V., Mialhe, E., Desprès, B., Figueras, A.J., (1994). Monoclonal antibodies against sporangia and spores of *Marteilia sp.* (Protozoa, Ascetospora). Disease of Aquatic Organisms, 18 : 211-216.

Robledo, J.A.F, Mialhe, E., Figueras, A.J.(1995). Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa : Ascetospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.). In J.S. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. Zelikoff, S.L. Kaatari, R.S. Anderson, K. Söderhall, B.A. Weeks-Perkins (Eds.), Techniques in Fish Immunology, Immunology and pathology of aquatic invertebrates, (pp. 117-121). Fair haven, N.J., U.S.A. SOS Publication.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. : Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor, N. Y, 1989.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 5463-5467.

Shyamala, V., and Ames, G.F.L. (1993). Genome walking by single specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR). Methods-Enzymol., 217 :436-446.

Sprague, V. (1979) Classification of the Haplosporidia. In : Haplosporidian and Haplosporidian-like Diseases in Shellfish (Perkins F.O., ed.). Marine fisheries Review, 41, 25-37.

Tigé, G. et Morel, M. (1974). Maladie de la glande digestive de l'Huitre plate. Science et Pêche, 241 : 33-36.

Tigé, G., Rabouin, M.A. (1976). Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huître plate. Cons. Int. Expl. Mer, C. M. K : 21 : 1-7.

Villalba, A., Mourelle, S.G., Carballal, M.J., Lopez, M.C., Azevedo, C. (1993). Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW of Spain). Etiology, phases of infection, a temporal and spatial variability in prevalence. Diseases of Aquatic Organisms, 16 : 61-72.

Wolf, P. (1979). Life cycle and ecology of *Marteilia sydneyi* in the Australian oyster, *Crassostrea commercialis*. In : Haplosporidian and Haplosporidian-like Diseases in Shellfish (Perkins F.O., ed.). Marine fisheries Review, 41, 70-72.