

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE
FACULTE DES SCIENCES
LICENCE DE BIOLOGIE DES ORGANISMES

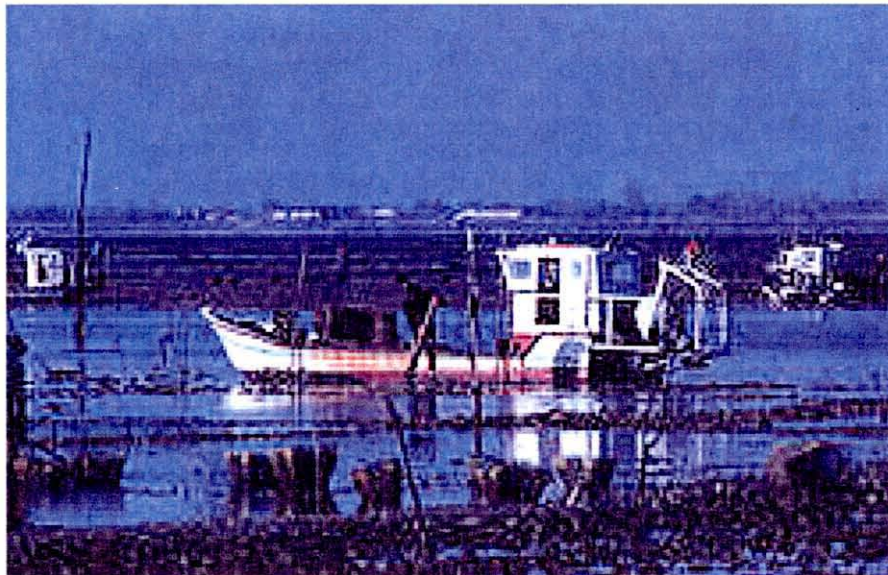
Rapport de stage (juillet-août 2000)

64806
E320-MOR.C
OLR 0181

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Caractérisation moléculaire des parasites du genre *Mycrocytos*

Par
Dimitri Moreau



Stage encadré par :

H. Montanié U. L. R

N. Cochenec IFREMER-Ronce les bains

Laboratoire de Génétique et Pathologie
B.P. 133 – 17390 La Tremblade

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 01181

RESUME

Les différentes productions ostréicoles mondiales sont à l'heure actuelle sérieusement mise à mal par différentes épizooties. Les responsables majeurs de ces maladies, sont des parasites protozoaires. Deux espèces sont responsables de la Bonamiose, une en Europe, *Bonamia ostrea* et une en Nouvelle Zélande et en Australie, *Bonamia* sp. Deux autres parasites provoquent des maladies différentes : *Mikrocytos roughleyi* qui sévit en Australie et *Mikrocytos mackini* au Canada. Ces quatre espèces infectant des zones différentes ne doivent en aucun cas venir coloniser des régions ou pays indemnes. C'est pourquoi il est important de pouvoir arriver à identifier leur présence chez un hôte le plus rapidement possible. Ces protozoaires étant assez proches morphologiquement, les méthodes traditionnelles de détection par observation microscopiques sont aujourd'hui leurs limitées. La biologie moléculaire pourra permettre, d'une part d'établir une phylogénie plus précise, et d'autre part de mettre au point des outils de détection moléculaires très fiables et simples d'utilisation. Les travaux entrepris au cours de ce stage ont permis d'effectuer une partie du séquençage du gène d'intérêt phylogénique, 18S, pour les deux espèces du genre *Mikrocytos*. Il est maintenant possible de préciser la position taxonomique du parasite *M.roughleyi*. En effet, ce parasite peut être placé dans la classe des *Haplosporidium* au vu des résultats d'analyse de séquence effectués. Malgré tout, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de combattre ces parasites efficacement mais l'avancé des recherches permet d'envisager la mise au point d'outils de diagnostic moléculaire capables de prévenir les risques de contamination des zones saines.

Remerciements

Je remercie avant tout Monsieur A. Gérard pour son accueil au sein du laboratoire IFREMER de Génétique et Pathologie de La tremblade.

Je remercie mes maîtres de stage Madame H. Montanié et tout particulièrement Madame N. Cochenec pour m'avoir encadré pendant 2 mois, pour m'avoir fait profiter de ses connaissances et pour sa confiance.

Je remercie S. Desbois technicienne de laboratoire pour son aide permanente, pour sa collaboration et pour m'avoir fait profiter de son expérience.

Je remercie M. Robert technicienne de laboratoire qui connaissant parfaitement le laboratoire m'a été d'une aide précieuse.

Je remercie toute l'équipe *Marteilia* : F. Berthe, F. Leroux et C. Audemar pour leur nombreux conseils.

Je remercie B. Chollet du laboratoire d'histologie pour son aide lors de la prise de photos de coupes histologiques.

Je remercie enfin les stagiaires M. Lucas et B. Verdon, les autres chercheurs et le reste du personnel pour m'avoir permis de passer deux mois trop courts dans une bonne humeur permanente.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
MATERIEL ET METHODES	
1. Extraction d'ADN	4
2. Réaction de polymérisation en chaîne	5
3. Clonage :	
3.1 Ligation	7
3.2 Transformation	8
3.3 Extraction plasmidique	8
4. Analyse de la séquence d'ADN	10
RESULTATS	
I/ Séquençage du gène 18S de <i>Mikrocytos roughleyi</i> :	12
1. Première partie du gène	12
2. Partie terminale du gène	13
3. La séquence	14
4. Analyse de la séquence de <i>M.roughleyi</i>	15
4.1 Blast avec Genbank	15
4.2 Alignement des séquences deux à deux	16
4.3 Carte de restriction	16
II/ Séquençage du gène 18S de <i>Mikrocytos mackini</i>	16
1. Séquençage de la partie terminale	16
DISCUSSION CONCLUSION	19
ANNEXES	
RAPPELS :	
- <i>Bonamia ostrea</i>	23
- <i>Bonamia</i> sp	25
- <i>Mikrocytos roughleyi</i>	27
- <i>Mikrocytos mackini</i>	28
Composition des différents réactifs, tampons et milieux utilisés	30
Présentation du Kit de clonage	31
Carte de restriction de la séquence de <i>M. roughleyi</i>	32
Systematique	35
Alignements des séquences	36
BIBLIOGRAPHIE	39

INTRODUCTION

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française avec une production d'environ 150 000 tonnes par an, classant la France au troisième rang mondial derrière le Japon et la Corée du sud. Cependant, l'ostréiculture est une activité fragile qui subit régulièrement des épizooties difficiles à combattre. Comparativement aux mortalités d'origine non infectieuse, dont les causes sont mal définies mais dont l'impact sur les cheptels est généralement limité quantitativement et géographiquement, de très nombreux cas de mortalité massive à caractère épidémique ou endémique ont été observés parallèlement à la mise en évidence d'agents infectieux. Des virus, des procaryotes et des parasites métazoaires et protozoaires ont été identifiés, révélant progressivement la diversité étiologique des maladies infectieuses chez les mollusques bivalves.

En 1979, l'apparition de *Bonamia ostreae*, parasite hémocytaire d'*Ostrea edulis*, entraîne la chute de la production d'huître plate française qui, aujourd'hui, ne représente plus que 1500 tonnes/an contre 150.000 tonnes en 1960. Le genre *Bonamia* regroupe deux espèces *B.ostreae* et *B.sp.* Cette dernière espèce parasite l'huître australienne *Triostrea lutaria*.

Dans les années 1950, des protozoaires associés à des mortalités de mollusques de la famille des Crassostréidés, ont été identifiés. Ils ont longtemps désignés sous le nom de « microcells », avant d'être replacés dans un nouveau genre : *Mikrocytos* (décrit à la suite d'études plus approfondies de mortalités apparues au Canada et en Australie par Farley en 1988). Deux espèces ont été identifiées, *M.mackini* et *M.roughleyi*, respectivement décrites pour la première fois par Mackin (1963) et Roughley (1926) chez *Crassostrea gigas* et *Saccostrea commercialis*.

L'identification de ces différentes espèces reposait jusqu'alors sur des observations en microscopie photonique et électronique et donc était basée sur des critères morphologiques et ultrastructuraux tels que la taille, la position du noyau et la forme des organites intracellulaires de type « haplosporosome » ou corps denses. Pour le genre *Bonamia*, plusieurs classifications se sont succédées, en 1980 Levine les classe dans le phylum des *Ascetospora* et la classe des *Paramyxia*, en 1988 Perkins révisé cette classification sur la base des propositions de Corliss et replace le genre *Bonamia* dans la classe des *Haplosporida* au côté du genre *Haplosporidium*. En revanche le genre *Mikrocytos* n'a jamais trouvé de place. Ces études controversées illustrent les limites des seuls critères morphologiques en taxonomie. La biologie moléculaire semble pouvoir compléter ces analyses, par l'étude par exemple de gènes d'intérêt phylogénique comme le gène 18S.

En ce qui concerne le diagnostic des infections, pour la bonamiose, il a progressivement été simplifié en substituant l'examen de coupes histologiques par celui de frottis. Ces derniers pouvant être préparés à partir de biopsies cardiaques. Cependant ces techniques restent relativement lourdes à mettre en œuvre et inadéquates pour quantifier les infections. C'est pourquoi, des techniques complémentaires de diagnostic et d'identification apparaissent nécessaires, en particulier ces techniques pourraient être utilisées pour aborder la recherche d'hôtes intermédiaires qui ont été suspectés par Hine : celui-ci ayant observé des protozoaires ressemblant à *Bonamia sp.* chez des mollusques sympatriques de *Triostrea lutaria*. A l'heure actuelle les gènes codant pour l'ARN ribosomiale 18S de *B.ostreae* et *B.sp* ont été séquencés (Cochennec et al). Plusieurs amorces universelles et spécifiques ont ainsi été mises au point. Au cours de ce stage, le travail a donc consisté à tenter d'obtenir la séquence du gène 18S de *Mikrocytos roughleyi* et de *Mikrocytos mackini* à partir d'ADN extrait de tissus d'huîtres parasitées ou de parasites purifiés en provenance respectivement d'Australie et du Canada.

MATERIEL ET METHODES

EXTRACTION D'ADN

Principe :

L'ADN est extrait de tissus d'huître parasitée, conservé dans l'alcool et dont le taux d'infestation est préalablement déterminé par observation de coupe histologique au microscope photonique. Les tissus les plus parasités seront sélectionnés pour l'extraction. L'ADN extrait ne peut être purifié et comportera de l'ADN d'huître et de parasite.

1/ Lyse des tissus :

Les tissus d'huître contaminée sont placés une nuit dans 1200µl de tampon de lyse complétés de 24µl de protéinase K de concentration 10ng/ml (l'enzyme est ainsi à une concentration de 20µl/ml de tampon) au bain marie à 37°C.

Le matin 24µl de protéinase K sont rajoutés dans les tubes. Ils sont replacés au bain marie à 37°C pendant une heure.

2/ Elimination des débris organiques :

Chaque tube est réparti dans trois Eppendorf de 1,5 ml (3x400µl), 400µl de phénol et de 400µl de chloroforme sont ensuite additionné dans chaque tube, le mélange est passé au vortex puis centrifugé 10 min à 4°C à 10 000 rpm. La phase aqueuse (au dessus) contenant l'ADN est récupérée, la différenciation des deux phases est facilitée par l'utilisation de chloroforme coloré en rose, la phase aqueuse est alors la phase incolore.

3/ Précipitation des acides nucléiques :

Une fois la phase aqueuse individualisée il faut ajouter 40µl d'acétate de sodium (de concentration 3 molaire et pH 4.8) et de 800µl d'éthanol absolu dans chaque tube. Le mélange est passé au vortex puis placé 1 heure à -80°C (permettant la précipitation de l'ADN). L'ADN précipité est centrifugé 10 min à 4°C à 10 000 rpm. Le surnageant est éliminé avec précaution à l'aide d'une micropipette, le culot contenant l'ADN ne doit en aucun cas se détacher du fond du tube. Le culot est rincé avec 400µl d'éthanol à 70% et le tout est recentrifugé 10 min à 4°C à 10 000 rpm. Le surnageant est une nouvelle fois éliminé avec précaution à l'aide d'une micropipette et le culot est mis à sécher sous hôte aspirante.

4/ Elimination de l'ARN :

Le culot sec est repris dans 50µl d'eau bidistillée + 1µl de RNase (à 1 mg/ml), la quantité de RNase ne doit pas être trop importante pour ne pas risquer une dégradation de l'ADN. Les tubes sont placés 35 min au bain marie à 37°C pour permettre l'action de l'enzyme.

5/ Nouvelle élimination des débris organiques :

Une fois l'ARN dégradé les étapes d'élimination des déchets et d'extraction sont renouvelées. Il faut donc additionner 50µl de phénol et 50µl de chloroforme dans chaque tube. Le mélange est passé au vortex puis centrifugé 10 min à 4°C à 14 000 rpm. La phase aqueuse (au dessus) contenant l'ADN est récupérée.

6/ Précipitation de l'ADN :

5µl d'acétate de sodium (de concentration 3 molaire et de pH 4.8) et de 100µl d'éthanol absolu sont placés dans chaque tube. Le mélange est passé au vortex puis placé 1 heure à -80°C (permettant la précipitation). L'ADN précipité est récupéré par centrifugation de 10 min à 4°C à 14 000 rpm. Le surnageant est éliminé avec précaution à l'aide d'une micropipette. Le culot est rincé avec 200µl d'éthanol à 70% et centrifugé 10 min à 4°C à 14 000 rpm. Le

surnageant est toujours éliminé avec précaution à l'aide d'une micropipette et le culot est mis à sécher sous hôte aspirante. Le culot est repris dans 50µl d'eau bidistillée.

La quantité d'ADN extraite peut être évaluée en effectuant une migration sur gel d'agarose à 1%, une bande de haut poids moléculaire doit apparaître

LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (P.C.R)

1/ Principe :

La réaction de polymérisation en chaîne est une technique permettant l'amplification in vitro d'ADN spécifique. Une polymérase thermostable (résistante à une température de 95°C) de la bactérie *Thermus aquaticus*, la Taq polymérase est utilisée pour catalyser la croissance de la chaîne à partir d'amorce d'ADN. Les amorces, correspondant à des brins opposés, sont allongées dans la direction l'une de l'autre. Lorsque la réplication du segment compris entre les deux amorces est terminée (un cycle), les deux duplex formés sont dénaturés par la chaleur pour produire des matrices monocaténaire et un second cycle de réplication est effectué en abaissant la température en présence de tous les composants requis pour la polymérisation. La répétition des cycles de synthèse et de dénaturation entraîne un accroissement exponentiel du nombre de fragments répliqués. Ainsi de très petite quantité d'ADN sont requise comme matrice et suffisamment d'ADN est amplifié pour qu'une bande visible sur gel soit obtenue.

2/ Les réactifs :

- Tampon de réaction 10X: 5µl
- MgCl₂ 50mM : 2.5µl
- dNTP 100mM: 5µl
- Amorces 100mM: 2*0,5µl
- Taq : 0,5µl
- H₂O : le volume d'eau bidistillée est ajusté en fonction de la quantité d'ADN matrice pour que le volume totale de la solution soit de 50µl.
- ADN : la quantité est évaluée en fonction de la concentration initiale de l'échantillon à analyser.

3/ Les étapes et le déroulement du cycle de la polymérisation en chaîne :

- l'ADN matrice est dénaturé pendant 3 minutes à 94°C.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- Dénaturation de 1 minute à 94°C.- Hybridation des amorces sur les matrices monocaténaire pendant 1min. La température peut varier en fonction des amorces, elle se situe entre 48 et 55°C.- Elongation, par la polymérase, pendant 1 min à 72°C (température optimale d'activité pour la Taq). |
|--|



Répétitions de 30 à 40 cycles.

- Une élongation finale de 10 min à 72°C permet à la polymérase de terminer la synthèse de tous les nouveaux brin d'ADN à partir des amorces qui se sont hybridés pendant les cycles.
- Les produits de PCR sont conservé à 4°C en attendant d'être analysés sur gel d'agarose.

Pour chaque analyse par PCR un témoin négatif (ne contenant pas d'ADN matrice) et un témoin positif (contenant de l'ADN réagissant aux amorces utilisées) permettent d'effectuer un contrôle, indispensable pour l'interprétation des résultats.

4/ Les différentes amorces utilisées :

Pour permettre l'amplification de séquences d'ADN des parasites étudiés, il a fallut utiliser des couples d'amorces associant une amorce universelle et une amorce spécifique de *Bonamia ostreae* ou deux amorces spécifiques. L'utilisation de deux amorces universelles ne permet, la plus part du temps, que d'amplifier de l'ADN d'huître (ce qui ne présente ici aucun intérêt), du fait que les extraction d'ADN ne sont que très rarement réalisées sur des parasites purifiés (ce qui n'a d'ailleurs jamais été le cas au cour de notre étude des parasites du groupe *mikrocytos*).

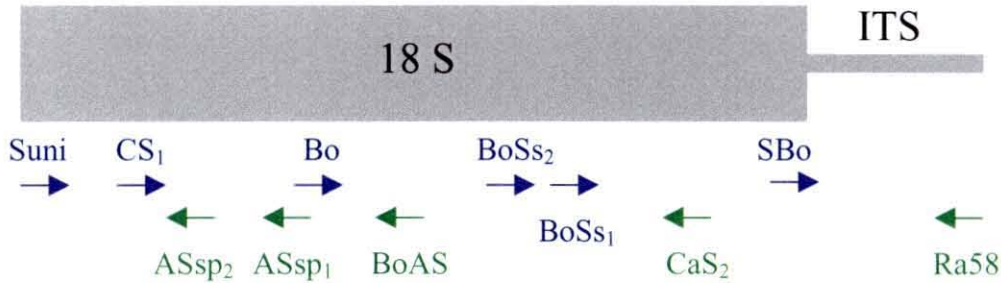
Les différentes amorces universelles et leurs séquences (dans le sens 5'→3' pour les amorces du brin sens comme pour celles du brin antisens) :

- Suni : CAA CCT GGT TGA TCC TGC C
- CS₁ : GTA ACG GGG AAT CAG GGT TCG
- CaS₂ : ACG GGC GGT GTG TAC AAA GG
- Ra58 : CGC ATT TCG CTG CGT TCT TC
- R1 (amorce universelle des *Haplosporidium* ne marchant que sur *M.mackini*) : CAGCAGATGGAA

Les différentes amorces spécifiques et leurs séquences (dans le sens 5'→3') :

- ASsp₂ : ATA AGC AAC CAG TTG GCC GC
- ASsp₁ : ATT AAA TGG CCA GAC CGG CG
- Bo : CCA TTT AAT TGG TCG GGC CGC
- BoAS : TCT GAT CGT CTT CGA TCC CC
- BoSs₂ : TAA CTA GCC GGC GCT AAC CC
- BoSs₁ : GTA ATC TTC AAC GCG CAC CC
- ITS 2.1 : CGT AGG TGA ACC TGC GAA GGA TC

Représentation schématique de la position et de l'orientation des différentes amorces :
Les amorces sens sont représentées en bleu et les amorces antisens sont représentées en jaune.



5/ Analyse des produits amplifiés :

Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 ou 2% en fonction de la taille du segment amplifié attendue.

La composition des tampons, un schéma explicatif et le détail de la technique d'électrophorèse sont présentés en annexe.

LE CLONAGE

Principe :

L'analyse du génome d'un organisme n'est possible que par la manipulation de petits fragments étudiés individuellement. Ainsi le clonage permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un élément génétique capable d'autoréplication, nommé vecteur, ce sont ensuite des bactéries qui servent d'hôtes pour l'amplification, il y a donc deux étapes : tout d'abord une ligation du fragment d'ADN à étudier dans un plasmide (vecteur), possédant un seul site d'insertion du fragment situé au niveau de marqueurs. Généralement, un marqueur de sélection est un gène codant pour une partie ou une enzyme entière capable de dégrader un sucre comme le X-gal qui permet de sélectionner les clones possédant effectivement un insert. Un deuxième marqueur de sélection concernant généralement un gène de résistance à un antibiotique est présent. La deuxième étape est une transformation bactérienne qui consiste à insérer le plasmide dans des bactéries dites « compétentes » (aptées à recevoir le vecteur). La dernière étape consiste à sélectionner les bactéries transformées.

I/ La ligation :

1/ Réaction de ligation :

La ligation se fait à partir d'un produit de PCR frais, qui devra s'insérer au niveau d'un gène codant pour une enzyme responsable de la dégradation du X-gal (les détails sur la composition du plasmide utilisé seront retrouvés en annexe).

PRODUITS	QUANTITE POUR 1 TUBE (en µl)
Eau stérile	4
Tampon de ligation 10X	1
Vecteur de pCR 2.1 à 25ng/µl (plasmide)	2
Produit de PCR frais (≅10ng)	2
T4 DNA ligase	1

Le tout est incubé à 14°C pendant au moins 4h00 (il est préférable de le laisser 1 nuit) pour permettre à l'enzyme d'agir. Le produit de ligation est placé à -20°C en attendant l'utilisation pour la transformation.

II/ La Transformation :

Le produit de ligation est centrifugé rapidement, puis il est placé sur la glace.

1/ préparation des cellules compétentes :

Le β -mercaptoethanol (β -ME) 0,5M, conservé à -80°C est décongelé sur un lit de glace, ainsi que les 50 μ l de cellules compétentes (bactéries) pour chacune des ligations/transformations, que l'on veut effectuer. 2 μ l de la solution de β -ME à 0,5M sont introduit à l'intérieur de chaque tube de cellules compétentes, le tout est mélangé doucement à l'aide d'un cône il ne faut surtout pas aspirer et refouler avec la pipette. 2 μ l de produit de ligation est introduit directement à l'intérieur des tubes de cellules compétentes, que l'on aura préalablement identifié. De même que précédemment, le tout est mélangé de façon douce, à l'aide d'un cône. Le mélange est laissé à incuber pendant 30min sur la glace.

2/ La transformation :

Pour permettre la pénétration du produit du vecteur dans les cellules compétentes il faut provoquer un choc thermique de, exactement, 30s dans un bain marie de 42°C. Le tube ne doit être ni agiter, ni mélanger, il est ensuite retiré du bain marie et placé sur un lit de glace pendant 2min.

3/ Mise en culture :

Les bactéries ainsi transformées sont mise en culture en ajoutant 250 μ l de SOC (milieu qui permet le développement des bactéries), qui est à température ambiante (conservé à -80°C), dans chaque tube, puis en plaçant le tout dans une étuve à 37°C et avec une agitation de 225rpm, pendant 1h00.

4/ Ensemencement sur boîte de pétri :

Les bactéries sontensemencées sur un milieu LB solide contenant 50 μ g/ml d'Ampicilline ou de kanamycium, ainsi que 40 μ l/boîte de X-Gal (ajouté au dernier moment); 80 μ l de cellules ayant subies le traitement de transformation sontensemencées par la méthode du râteau. Il est important de s'assurer qu'il n'y a plus de liquide à la surface des boîtes de pétrie (2 par transformation), avant de les placer à l'étuve à 37°C pendant au moins 18h00. Les boîtes doivent ensuite être placées à +4°C pendant 2 à 3h00 afin que la coloration des colonies (bleue ou blanche) n'apparaisse complètement.

III/ Extraction plasmidique :

Mini-purification de plasmide (protocole pour le kit commercialisé par QIAGEN)

Ce protocole a été élaboré pour des plasmides dont l'ADN a été intégré par des bactéries appartenant à *E. coli*.

Avant toute chose, il faut centrifuger $2 \times 1,5\text{mL}$ de la suspension bactérienne dans un Eppendorf de 1,5mL. La centrifugation est faite à 12 000 tours pendant 5min et permet de récupérer un culot de bactéries.

1/ Remise en suspension les bactéries :

Après avoir ajoutée la Rnase A à la solution P1, Les bactéries sont totalement remises en suspension avec 0.3ml de P1. Ce tampon contenant du Tris et de l'EDTA fragilise les parois cellulaires.

2/ lyse des cellules :

0,3mL de solution de tapom P2 est ajouté. Il doit être mélangé doucement, et doit donner un mélange homogène. Pour ce faire, il faut renverser les tubes 4 à 6 fois et ne surtout pas passer les tubes au vortex. Enfin il faut laisser incuber à température ambiante pendant 5min. Cette solution contenant du SDS et du NaOH va casser la membrane et l'ADN chromosomique, en laissant les plasmides intacts du fait de leur conformation superenroulée à ce pH situé entre 12 et 12.5.

3/ neutralisation et précipitation des déchets :

0,3mL de la solution P3 (conservé à 4°C) est additionné, le tout est mélangé immédiatement mais doucement, et incubé sur la glace pendant 5min.

La solution P3 ainsi que l'incubation sur glace, entraîne la formation d'un précipité. Après l'addition de la solution P3, la suspension devient trouble et visqueuse. Afin de permettre la précipitation, il faut mélanger doucement les tubes, comme précédemment. Les lipides, les protéines, les fragments d'ADN chromosomiques précipitent grâce à l'acétate, après neutralisation du pH par le potassium.

4/ élimination des déchets :

Avant d'être centrifugés, les échantillons doivent être remélangés, doucement. Les tubes sont centrifugés à 12 600 tours pendant 10min. Ensuite, le surnageant, contenant les plasmides, est retiré rapidement. Après centrifugation, le surnageant doit être clair. Si tel n'est pas le cas, il faut recentrifuger la solution.

5/ Equilibration des colonnes :

Ce Kit utilise le principe de la chromatographie d'affinité électrostatique entre les molécules d'ADN chargées négativement grâce aux groupements phosphates et les molécules de DEAE chargées positivement. Pour cela les colonnes de résines doivent donc être équilibrées pour que les conditions de pH et de salinité soit réunies pour « activer » les particules chargées. La colonne QIAGEN-tip 20 est donc équilibrée en la remplissant de 1mL de solution QBT, et en laissant le liquide s'échapper par gravité.

6/ Elimination des déchets restants :

Le surnageant obtenu à l'étape 4 est introduit dans la colonne QIAGEN-tip 20. Le tout est lavé avec une solution peut saline, $4 \times 1\text{mL}$ de solution QC. Cette solution élimine les ARN, les protéines, les hydrates de carbone et les petits métabolites restants.

7/ Elution des plasmides :

L'ADN plasmidique est élué avec 0,8mL de solution QF, qui est une solution plus saline et « détache » l'ADN. Le tout est récupéré dans un eppendorf de 1.5ml.

8/ Précipitation de l'ADN :

L'ADN est précipité avec 0,7ml d'isopropanol. Le tout est centrifugé à 10 000rpm à 4°C pendant 30min. le surnageant est ensuite éliminé avec précaution à l'aide d'une micropipette en prenant bien garde de ne pas décrocher le culot très petit.

9/ Lavage de l'ADN :

Le culot d'ADN est lavé avec 1ml d'éthanol à 70%. Le tout est centrifugé à 10 000rpm à 4°C pendant 10min. le surnageant est éliminé et le culot est mis à sécher sous hôte aspirante.

10/ Resuspension de l'ADN :

Le culot est resuspendu dans 20µl de TE. Les tubes sont conservés à -20°C.

ANALYSE DE LA SEQUENCE D'ADN

I/ Comparaison à des séquences connues :

Le logiciel « Blast » du site : www.ncbi.nlm.nih.gov, permet de confronter la séquence obtenue à une banque de séquences déjà publiées, apportant ainsi une première approche phylogénique, en ciblant un phylum comparable du point de vue génétique. De plus, il permet aussi de diminuer les erreurs possibles, dû à des problèmes de contamination, lors de la publication des résultats.

II/ Alignement des séquences :

Le logiciel « Clustlaw multiple alignment » du site : pbil.ibcp.fr/cgi-bin, permet l'alignement des séquences de *Bonamia ostreae* et *Bonamia* sp à celle de *Mikrocytos roughleyi* nouvellement séquencée et ainsi avoir une nouvelle base de comparaison.

III/ Carte de restriction :

Les cartes de restrictions des séquences de *B.ostreae*, *B.sp* et *M.roughleyi* ont été réalisées avec le logiciel Cutter du site : www.medkem.gu.se. Il permet de connaître : la position des sites de coupure des différentes enzymes de restrictions coupant une à deux fois (le nombre de coupures ayant été réduit pour ne pas obtenir de fragments trop petits impossible à différencier sur gel d'agarose), la taille des fragments obtenus après l'action des enzymes, et le nom des enzymes ne coupant pas la séquence proposée.

RESÜLTATS

I/ Séquençage du gène 18S de *Mikrocytos roughleyi* :

C'est à partir d'ADN extrait de tissus d'huître parasitée conservés dans l'éthanol que plusieurs tentatives d'amplification de séquence du gène 18S ont été réalisées. Pour cela différents couples d'amorces ont été testés pour amplifier des séquences de quelques centaines de paires de bases par PCR. Les différents couples testés sont :

- BoSs₁-Ra58
- BoSs₂-Ra58
- Bo-Ra58
- Suni-ASsp₁
- SBo-Ra58
- CS₂-CaS₂
- Bo-CaS₂
- BoSs₁-CaS₂
- BoSs₂-CaS₂

1. La première partie du gène :

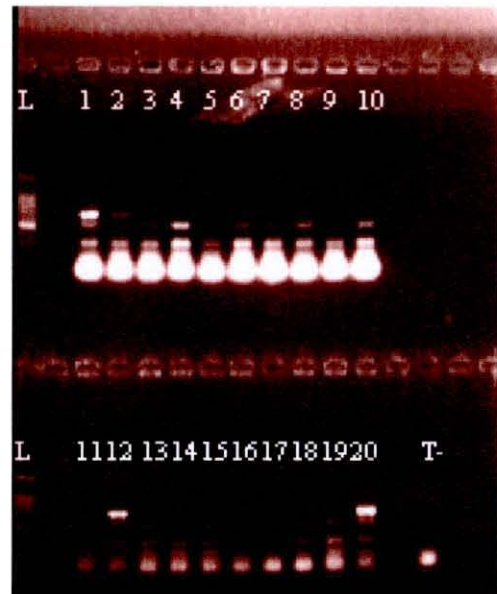
Les premiers résultats positifs ont été obtenus avec le couple d'amorce Suni-ASsp₁.

PCR avec une amorce universelle, Suni, et une amorce spécifique de *Bonamia ostreae*, ASsp₁, l'ADN extrait de tissus d'huître australienne fortement parasitée, conservés dans l'éthanol. Sur 16 échantillons d'ADN deux ont été utilisés pour la PCR les autres étant trop pauvres en ADN. Résultats par migration sur gel d'agarose à 1% à 90V pendant 30 minutes :



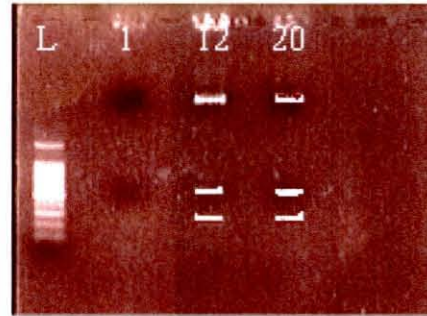
Chez *Bonamia ostreae* la taille du fragment d'ADN compris entre les amorces, Suni et ASsp₁, mesure 740 paires de bases, on obtient ici pour l'échantillon n°2 une bande de 700 paires de bases environ correspondant bien à la longueur du fragment d'ADN attendu.

Le produit de PCR n°2 est ligué au vecteur pCR 2.1. Des bactéries compétentes sont ensuite transformées par ce produit de ligation. Après mise en culture sur milieu solide 20 clones blancs sélectionnés, subissent une vérification par PCR de la présence du bon insert et sont repiqués dans une nouvelle boîte de pétri. Résultat de la PCR par migration sur gel à 1% :



Les clones 1,12 et 20 réagissent positivement et possèdent donc le bon insert, ils sont sélectionnés pour l'extraction plasmidique.

La dernière vérification avant l'envoi au séquençage consiste à digérer, les plasmides extraits, par Eco RI pour libérer l'insert. Résultats par migration sur gel d'agarose à 1% :



La digestion par Eco RI libère l'insert pour les clones 12 et 20, l'insert est lui-même digéré en deux fragments plus courts, un d'environ 200 paires de bases et l'autre d'environ 500 paires de bases.

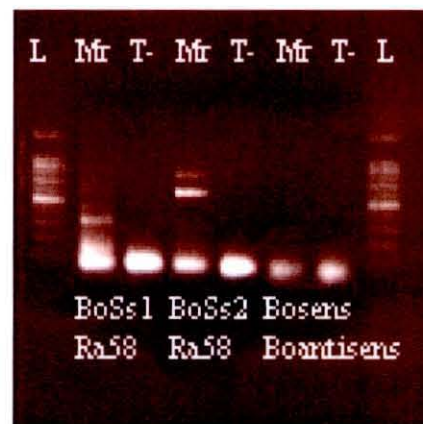
L'échantillon n°12 est envoyé à séquençer.

2. La partie terminale du gène :

Le couple d'amorce SBo-Ra58 a permis d'amplifier une séquence d'un peu plus de 200 paires de bases comprenant la séquence ITS (séquence, excisée après la transcription et dégradé dans le noyau, et très polymorphe du gène 18S). Des problèmes survenus lors de la transformation et de l'extraction plasmidique n'ont pas permis l'envoi au séquençage.

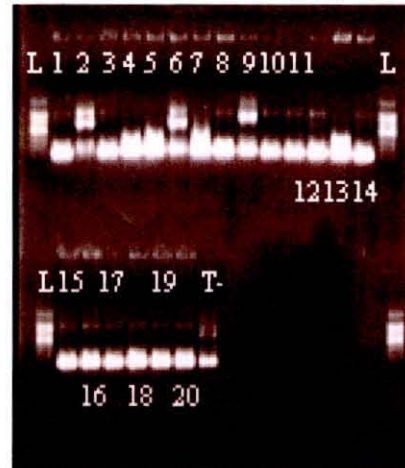
Enfin l'utilisation du couple BoSs₂-Ra58 a permis d'amplifier une séquence d'environ 600 paires de bases comprenant elle aussi l'ITS.

PCR avec un échantillon ADN de *Mikrocytos roughleyi* avec trois couples d'amorces :
 - BoSs₁-Ra58
 - BoSs₂-Ra58
 - Bosens-Boantisens

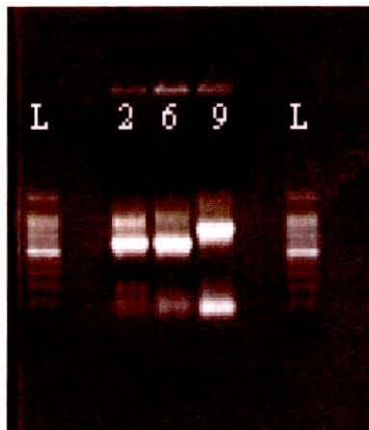


La bande d'environ 600 paires de bases obtenue pour le couple BoSs₂-Ra58 correspond bien à la taille attendue par comparaison avec celle de *Bonamia ostrea*.

Le produit PCR est ligué au vecteur pCR 2.1, les bactéries compétentes sont transformées. 20 colonies blanches sont sélectionnées et subissent une vérification, par PCR, de la présence de l'insert. Résultat par migration sur gel d'agarose à 1%.



Les clones 2, 6 et 9 semble posséder l'insert recherché, mais la mauvaise qualité de l'électrophorèse ne permet de vérifier la taille exacte des bandes, une deuxième migration est donc effectuée avec les clones 2,6 et 9 :



Il apparaît donc grâce à cette nouvelle électrophorèse que seul les clones 2 et 6 possèdent le bon insert, ils sont donc sélectionnés pour l'extraction plasmidique.

Malheureusement, des problèmes d'extraction plasmidiques ont rendu impossible l'envoi au séquençage.

3. La séquence :

Le séquençage des inserts inclus dans les plasmides extrais a permis d'obtenir la séquence suivante (seul le brin sens est présenté ici):

les amorces sens étant représenté en vert et la position des antisens en bleu (la séquence est donc inversé étant donné qu'elle est représenté sur le brin sens), la séquence comprise entre Bo et BoAS avait été obtenue antérieurement.

5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTCAAAGATTAAGCCAT
GCATGTCCAAGTATAAACACGTTTGTACTGTGAAACTGCAGATGGCTCATTACAA
CAGTTATAGTTTATTTGACATTGAACTGTTACACGGATAACCGTAGTAACCTAGG
GCTAATACGTGACAAACCCTGCTCGCAGGAGTGCATATTAGCTGAAAACCAACTT
TGGTTGAATAATAATATTTGTTCGGATCGCGTTGGCCTCGCCAGCGACATGTCATTC
AAGTTTCTGACCTATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTTTGACG
GGTAACGGGGAATGCGGGTTCGATTCCGGAGAGGCAGCCTGAGAAACGGCTACC
ACATCCACGGGAGGCAGCAGGTGCGCAAATTACCCAATTCTGACTCAGAGAGGT
AGTGACAAGAAATAACGATCGGCGGCCTTCGGTTGCCTATTCGGAATGAGAACA
ATGTAAAAGCCTTATCGAATTCCAGCGGAGGGCAAGCCTGGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACCAGCTCCGCTAGCGTATACTAAAGTTGTTGCTG TAAAACGCCCGTA
GTTGGATATCTGCCCGCCCGGGCCGGACTCGCGACGCACCTGCGCCTGCGGCCG
ASp₁
GCCGCGGGGCATAATTCAGGAACGCCGGTCTGGCATTAAATTGGTTCGGGCGCG
TGGTCCTGATCCTTTACTTTGAGAAAATTAAGTGCTCAAAGCAGGCTCGCGCCT
GAATGCATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCACCGCCACTCGTGGCG
GGTGTGTTTGGTTTGGTTTGGAGCTGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGGGGTGC
TAGTATCGCCGGGCCAGAGGTAATAATTCTTTAATTCCGGTGAGACTAACTTATGC
BoAS
GGAAGCATTACCAAGCGTGTTTTCTTTAATCAAGAACTAAAGTTGGGGGATCGA
AGACGATCAGA-3'

4. Analyse de la séquence de *Mikrocytos roughleyi* :

L'analyse de la séquence par les différents logiciel, détaillé en matériel et méthode, a permis d'obtenir plusieurs résultats.

4.1 : Tout d'abord le logiciel blast a pu rapprocher la séquence obtenue de celle de différents protozoaires connus. Après *Bonamia ostrea*, les protistes présentant le plus d'homologie avec la séquence de *Mikrocytos roughleyi* appartiennent à la classe des Haplosporidies et au genre *Haplosporidium* et concerne les espèces *H.costale* et *H.nelsoni* les références des séquences retenues étant HCU20858 pour le premier et HNU19538 et HNSSRNA pour le second. *H.nelsoni* infecte les huîtres, *Crassostrea gigas* et *virginica*, dans le pacifique ainsi que les huîtres élevées en France et en Corée. Les mortalités apparaissent au printemps, et touche principalement les juvéniles. *H.costale* est présent aux USA, touche *Crassostrea virginica* et cause une mortalité saisonnière en mai et juin. Pour ces deux parasites le développement maximum a lieu dans des eaux à salinité élevée. Une troisième espèce d'un genre proche présente des similarités de séquence : *Minchinia teredinis*, parasite de mollusques foreur de bois : *Teredo navalis*, *T.furcifera* et *T.bartschi*, vit dans les eaux à forte salinité le long de la côte atlantique des Etats Unis, avec les séquences MTU20319 et MTU20320. Un autre genre possède apparemment des séquences pouvant être aligné à celle de *M.roughleyi* : le genre *Cryptosporidium*, regroupant plusieurs espèces toutes parasites du système digestif de la souris. Les première séquences retenues, sont celles de *C.serpentis*, AF151376, AF093501, AF093502 et AF093499, ainsi que celles de *C.muris*, AF093496, AF093498 et AF093497.

4.2 : Le logiciel d'alignement des séquences a permis de comparer les séquences de *Bonamia ostreae* et *B. sp* déjà connues à la nouvelle séquence de *Mikrocytos roughleyi*. Des pourcentages d'homologie ont ainsi été obtenus : - sur 1070 paires de bases (comprises entre les amorces Suni et BoAS), il y a 918 pb (85.79%) communes et 152 pb (14.21%) différentes entre *M.roughleyi* et *B.ostreae*.

- sur ces mêmes 1070 pb, il y a 949 pb (88.61) communes et 122 pb (11.39%) différentes entre *M.roughleyi* et *B.sp*.

4.3 : Les cartes de restrictions des séquences de *B.ostreae*, *B.sp*, *M.roughleyi* ont été comparées pour mettre en évidence des différences. Les enzymes retenues ont été sélectionnées au niveau de la séquence comprise entre les amorces Bo et BoAS et sont : Bgl I qui ne coupe que *B.ostreae* en deux séquences, une d'environ 120 paires de bases et une de 150 paires de bases, et quasiment au même endroit Hae II coupe *B.ostreae* et *B.sp*.

II/ Séquençage du gène 18S de *Mikrocytos mackini* :

Dans le cas de *Mikrocytos mackini* les extractions d'ADN ont été réalisées sur des tissus d'huître parasitée conservés dans l'alcool et sur des culots de parasites purifiés conservés dans l'éthanol absolu. Pour ce parasite la même démarche a été entreprise, les couples d'amorces testés sont :

- CS₁-R₁
- ITS 2.1-Ra58

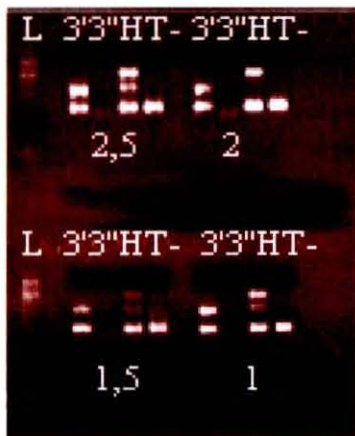
Le couple d'amorces CS₁- R₁ est testé sur les ADN extraits de tissus d'huître et de parasite purifié et ne donne qu'un résultat très faible pour un seul échantillon d'ADN, inutilisable pour effectuer un clonage.

1. Séquençage de la partie terminale du gène :

Une première PCR, avec le couple d'amorce ITS 2.1-Ra58, est réalisé, sur trois ADN extrait de parasites purifié, correspondant au tube : 1, 1', 1'', 2, 2', 2'', 3, 3' et 3'', et sur deux ADN extrait de tissus parasités (palpes labiaux). D'après les études précédentes, il a été remarqué que ce couple d'amorce amplifiait une séquence d'ADN d'huître, il a donc fallu ajouter un témoin contenant de l'ADN de l'huître *Crassostrea gigas* pour pouvoir identifier la bande correspondant à la séquence de *M.mackini*.



L'échantillon d'huître, noté H, a amplifié une séquence d'environ 800 paires de bases, cette même amplification s'observe pour les échantillons P1 et P2, correspondant à l'ADN extrait des palpes d'huîtres parasitées, ce produit de PCR ne présentant aucun intérêt dans le séquençage de *M.mackini*, ne sera donc pas utilisé pour le clonage. En revanche les échantillons 3' et 3'' amplifiés, correspondant à de l'ADN de parasite purifié, montrent une séquence plus courte, d'environ 300 paires de bases, correspondant vraisemblablement à celle du parasite. Malgré tout, une faible bande, plus petite encore, correspondant à une amplification aspécifique, risque d'être cloné et par la suite de fausser les résultats du séquençage. C'est pourquoi une nouvelle PCR est réalisée avec une gamme de MgCl₂ (50mM): 1µl, 1.5µl, 2µl et 2.5µl, sur les ADN 3' et 3'', pour éliminer cette bande.



La bande aspécifique est ici quasiment éteinte pour l'échantillon 3' et 1.5µl de MgCl₂, ce produit de PCR sera donc utilisé pour le clonage et le séquençage.

Là encore des problèmes de clonage non pas permis le séquençage.

DISCUSSION CONCLUSION

L'importance des activités conchylicoles mondiales a motivé la majorité des recherches développées en pathologie infectieuse des mollusques bivalves. En effet la plupart des agents infectieux ont été décrits chez des espèces économiquement importante pour chaque pays concernés.

Ce travail s'insérant dans le projet de mise au point d'outils diagnostiques pour les parasites du groupe « microcells », a eu pour but de contribuer à compléter les connaissances, déjà acquises pour les parasites *Bonamia ostreae* et *Bonamia.sp*, en réalisant les séquences des gènes 18S, pour les parasites *Mikrocytos roughleyi* et *Mikrocytos mackini*.

Le séquençage présente plusieurs intérêts. En premier lieu il apparaît important de classer ces parasites, qui jusqu'à présent n'avaient été décrits que par des observations morphologiques en microscopie photonique et électronique. Tout comme les études classiques, les études de phylogénie moléculaire reposent sur l'hypothèse que les ressemblances sont d'autant plus nombreuses entre deux organismes que leur lien de parenté est plus étroit. Comme pour la morphologie seules les homologies sont porteuses d'information. Cependant, cette analyse ne se fait plus par comparaison de caractères morphologiques, mais par comparaison des séquences de gène. Malgré tout, le choix des séquences à comparer est pendant longtemps resté problématique car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet pour comparer des organismes très éloignés, il faut utiliser un domaine qui reste sensiblement conservé pendant des centaines de millions d'années ou plus, tandis que la comparaison d'espèces proches requiert un domaine où des mutations se seront accumulées en quelques millions d'années ou moins. La solution de ce problème est apparue avec la comparaison des séquences d'ARN ribosomiques (ARNr) qui possèdent toutes les qualités requises : leur présence est universelle, ils ont une fonction conservée, la pression de sélection qui s'exerce sur eux est peu dépendante des variations du milieu externe et ils sont constitués d'une alternance de domaines variables (ITS) et de domaines conservés. Parmi les ARNr présents (5S, 18S, 28S), l'ARNr 18S s'est imposé comme molécule de référence et l'étude de l'histoire évolutive d'un organisme implique actuellement une étude phylogénique des séquences d'ARNr. Le choix universel de ces molécules a permis la construction rapide d'une banque de données de séquences devenue sans égale. Des représentants de tous les grands phylums d'animaux ont été séquencés; les plantes, les protistes et les champignons étant très fortement représentés. Il faut signaler enfin que les ARNr sont codés par des gènes souvent présents en très nombreuses copies et que des phénomènes d'homogénéisation (aux mécanismes encore mal connus) conservent identiques toutes ces copies. Cette organisation, nommée famille multigénique, a pour résultat que la séquence de ces gènes varie peu entre individus et qu'elle est représentative de l'espèce (ou éventuellement d'une population) plutôt que de l'individu.

Pour arriver au séquençage du gène 18S plusieurs étapes ont dû être répétées au fur et à mesure de l'avancé des résultats. En effet, l'ADN matrice utilisé était, dans la plus part des cas, extrait de tissus d'huîtres parasités, ainsi la distinction entre l'ADN de l'hôte et celui du parasite n'étant pas possible lors de l'extraction, il a fallu arriver à individualiser de court fragments spécifiques du gène 18S du parasite. C'est donc grâce à la technique de la PCR qu'il à été possible d'amplifier des séquences utilisables pour le clonage puis le séquençage. Cependant, cette technique très efficace d'amplification peu poser un problème lorsque, comme ici, elle n'est pas utilisé sur de l'ADN purifié d'une espèce donnée. En effet, dans ce cas l'amplification, non contrôlée par l'utilisation de couple d'amorces adaptés, ne peut être spécifique du gène recherché. C'est pourquoi, tous les couples d'amorces utilisés comportent impérativement au moins une amorce spécifique du gène 18S de parasite d'un genre supposé proche des protozoaires étudiés. Dans le cas présent les amorces étaient spécifiques du

parasite *Bonamia ostreae*, et les amorces universelles capable de s'hybrider, sur de l'ADN du 18S, d'un individu de n'importe quel phylum ou presque, n'ont donc été utilisés au maximum quand un seul exemplaire par couple. Un autre problème rencontré, lors de l'analyse de l'ADN extrait de tissus d'huître, est celui de la fragmentation des ADN dûe très vraisemblablement à des problèmes de conservation des échantillons (la conservation dans l'alcool parfois prolongé pourrait en être la cause). C'est pourquoi, le gène de *Mikrocytos roughleyi* a été analysé en trois fragments différents, de longueur variable, pas retrouvés intacts dans tous les échantillons d'ADN utilisés. Malgré tout, bien que de bons résultats aient été obtenus pour la séquence du début du gène 18S de *M.roughleyi* des problèmes de clonage pour les deux autres séquences (le milieu et la fin) ont grandement ralenti le travail ne permettant pas à l'heure actuelle de dévoiler la séquence entière du gène.

La séquence de *M. roughleyi* obtenue a pu être analysée, grâce à l'utilisation de différents logiciels de traitement des données, et une première analyse phylogénique a été obtenue par l'alignement de la séquence à une banque de gène. La séquence a montré des homologies avec de celle d'autres protozoaires, comme deux espèces du genre *Haplosporidium*, toutes deux parasites d'huître, du genre *Minchinia* parasite de mollusque, et la plus importante avec le genre *Bonamia*. Il semble alors possible d'avoir une idée beaucoup plus précise de la position de *M.roughleyi* dans le phylum des *Alveolata*. L'étude des cartes de restriction a permis de déterminer deux enzymes de restriction capables d'apporter une confirmation des résultats obtenus, malheureusement des problèmes de contamination, avec apparemment de l'ADN de *Bonamia sp.*, a rendu impossible la mise au point du protocole de digestion enzymatique sur les trois types d'ADN à tester.

Bien que la possibilité d'une étude phylogénétique, soit le premier apport du séquençage, il présente aussi un intérêt primordial pour la mise au point d'outils de diagnostic spécifiques. En effet, la connaissance de la séquence permet d'une part la mise au point d'amorces nucléiques spécifiques utilisables pour réaliser des amplifications par PCR. Utile pour permettre, éventuellement, l'étude d'un nouveau parasite proche. Mais aussi et surtout pour réaliser de la détection du parasite par PCR, avec des sondes spécifiques, sur des hôtes sympatriques, pouvant être un intermédiaire pour le développement ou alors un vecteur capable de transmettre la maladie en cas de transport vers des zones non encore contaminées. Par exemple, ces techniques sont utilisées à l'heure actuelle pour le parasite *Martelia refringens* (parasite d'*Ostrea edulis* et de *Mytilus edulis*) dont le gène 18S à lui aussi été séquencé (Berthe, Leroux et al 1999). Des outils de détection en biologie moléculaire ont été mis au point (Leroux, Audemar et al 1999) permettant la recherche du parasite dans de nombreuses espèces sympatriques des huîtres.

D'autre part c'est à partir de la séquence d'ADN qu'il est possible de mettre au point des sondes nucléiques marquées avec un anticorps, utilisées en hybridation in situ. Des essais ont d'ailleurs été réalisés, lors de ce stage, avec des sondes marquées à la digoxigénine ou avec un marquage par la biotine, sur des coupes histologiques d'huître infectées par *B.ostreae*, *B.sp* et *M.roughleyi*. Il reste encore aujourd'hui à parfaire la mise au point des protocoles d'hybridation in situ, les résultats obtenus n'étant pas concluants.

En taxonomie, des hypothèses nouvelles sont proposées dans le cadre d'une démarche de recherche fondamentale, les méthodes d'analyse sont souvent nouvelles et il faut s'attendre à de nombreux progrès dans ce domaine, tant au niveau de la facilité d'utilisation des méthodes que de leur fiabilité. Il ne s'agit pas de remplacer les approches traditionnelles, mais bien de les compléter par les nouvelles méthodes dans des domaines où la taxonomie classique présente des limites. Les méthodes moléculaires en cours de développement permettent

d'envisager, dans le cas présent, une identification automatique des différents parasites en cause dans les épizooties rencontrées.

Malgré tout, il est important de noter quelles sont les difficultés rencontrées actuellement par une telle approche moléculaire. Le problème majeur étant bien entendu de mener à bien le séquençage des ARNr, car comme cela a été le cas ici, différents problèmes ralentissent énormément le travail peuvent survenir. De plus, malgré la fiabilité des méthodes, il reste des risques d'erreurs, principalement dû à des problèmes de contaminations, faussant les résultats obtenus (ce qui a déjà été le cas lors du séquençage du gène 18S de *B.ostreae* par une équipe américaine). Enfin, les résultats présentés doivent être confirmés soit par comparaison avec les résultats «classiques» soit, d'une manière plus générale, par comparaison avec des phylogénies d'autres régions du génome.

Ainsi, une fois les résultats confirmés, ces travaux permettront d'envisager la mise au point d'outils diagnostic à la fois simples d'utilisation et extrêmement fiables, permettant dans un premier temps d'éviter, au maximum, tout risque de contamination des zones saines, et par la suite de combattre efficacement les différentes épizooties en cause.

ANNEXES

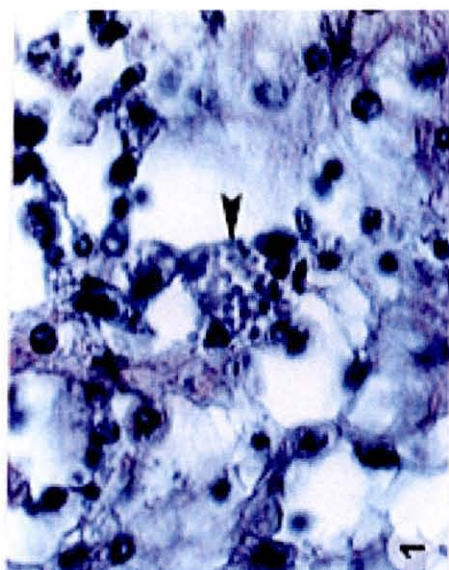
Bonamia ostreae

Nom commun de la maladie :

La bonamiose, maladie hémocytaire de l'huître plate.

Nom scientifique ou affiliation taxonomique :

Bonamia ostreae.



Observation en microscopie photonique, grossit 1000 fois, de tissus conjonctif d'huître *Ostrea edulis* infecté par *B.ostreae*. La flèche met en évidence un hémocyte infecté.

Distribution géographique :

Ce parasite se retrouve en Europe (le long de la côte d'Espagne vers le Danemark, l'Irlande et la Grande-Bretagne (à l'exclusion de l'Ecosse) et sur les côtes ouest (la Californie et Washington) et est (Maine) des Etats-Unis.

Espèces hôtes :

L'huître plate *Ostrea edulis* est l'hôte naturel, expérimentalement les espèces *Ostrea angasi* et *Tiostrea chilensis* (= *Tiostrea lutaria*) ont pu être infectées. Les huîtres creuses *Crassostrea gigas* n'ont pas pu être infectés expérimentalement. Des observations de « Microcells » dans les cellules vésiculaires de tissu conjonctif d'*Ostrea conchaphila* dans l'Orégon au Etats-Unis ont été spéculés pour être des parasites de *B.ostreae* (Farley et al 1988). Cependant, Elston (1990) a indiqué que bien que les expériences suggèrent que *O.conchaphila* puisse contracter la maladie, l'infection n'a pas été franchement démontrée.

Impact sur l'hôte :

Bien que beaucoup d'huîtres infectées semblent normales, d'autres peuvent avoir une décoloration jaune et/ou des lésions étendues (c.-à-d. des ulcères perforés) sur les branchies et le manteau. La pathologie réelle semble être corrélée avec la destruction des hémocytes dus à la prolifération des parasites de *B.ostreae*. Les lésions se produisent dans les tissus conjonctifs des branchies, du manteau, et de la glande digestive. Bien que quelques huîtres plates meurent avec des infections légères, d'autres succombent à des infections beaucoup plus lourdes. Dans une étude, la présence de *Bonamia* a été liée à la taille plus qu'à l'âge de l'huître et le niveau d'infection était statistiquement indépendant du stade de développement gonadal (Cáceres-Martínez *et al.* 1995). *Bonamia ostreae*, en même temps qu'une épizootie provoquée par *Martelia refringens*, a causé une baisse importante de la production française d'*O. edulis* de 20.000 t par an dans les années 70 à 1.800 t en 1995 (Boudry *et al.* 1996).

Technique de diagnostic :

Histologie: Examen de sections transversales de tissus. Les parasites *Bonamia ostreae* sont distribués systématiquement dans tout l'organisme dans le cas des infections avancées. Pour des infections plus faibles, on observe souvent des parasites dans les hémocytes, associés à des infiltrations du tissu conjonctif des branchies et du manteau, et dans les sinus vasculaires autour de l'estomac et de l'intestin.

Méthodes de contrôle :

Il est important de s'assurer qu'aucune huître plate des Etats-Unis ou d'Europe ayant vécu dans des zones où la bonamiose est connue pour se produire, ne soit importée sur une zone saine. Si des animaux infectés sont mis en contact avec une population saine, des mortalités élevées peuvent survenir pendant plusieurs années. Les régions en eau profonde, sont moins sévèrement affectées que les zones intertidales. Quelques huîtres parasitées des zones endémiques peuvent être asymptomatiques et donc difficilement diagnostiquées par les techniques actuellement utilisées.

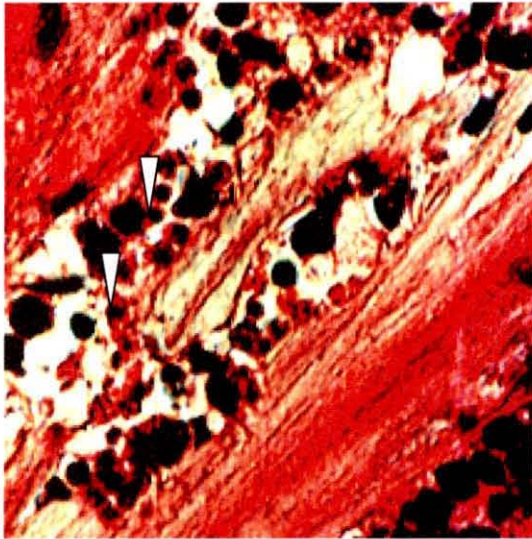
Bonamia sp

Nom commun de la maladie :

La Bonamiose, la maladie hémocytaire des huîtres.

Nom scientifique ou affiliation taxonomique :

L'espèce *Bonamia* sp est actuellement distinguée de l'espèce *Bonamia ostreae*.



Observation en microscopie photonique, grossit 1000 fois, de tissus musculaire et conjonctif d'une huître infectée par *B.sp.* Les flèches mettent en évidence deux de ces parasites, libres dans les tissus.

Distribution géographique :

- Détroit de Foveaux et d'autres emplacements au sud de la Nouvelle Zélande.
- Lac Victoria et la Tasmanie, Australie.

Espèce hôtes :

- Tiostrea chilensis* (= *Tiostrea lutaria*).
- Ostrea angasi*.

Impact sur l'hôte :

Comme pour *B.ostreae*, ce protozoaire intrahémocytaire devient rapidement systémique avec des nombres important de parasites coïncidant avec la mort de l'huître. Des mortalités de grande puissance de l'huître indigène de drague (91% entre 1975 et 1992 dans le détroit de Foveaux, en Nouvelle Zélande) ont été attribuées à ce parasite. Il y a une variation saisonnière de l'infection avec les plus hauts prévalences durant l'automne austral (avril).

Techniques de diagnostic :

Histologie: Examen de sections transversales de tissu infectés. Les parasites sont distribués systématiquement dans des infections avancées. Dans des infections moins avancées, *Bonamia* est souvent observé dans les haemocytés, dans des infiltrations localisées dans le tissu conjonctif des branchies et du manteau, et dans les sinus veineux autour de l'estomac et de l'intestin.

Méthodes de contrôle :

Jusqu'ici il n'y a aucune procédure connue d'éradication ou de contrôle. Jusqu'à ce que les modes de transmission et la spécificité de l'hôte de ce parasite ne soit déterminés par des

études approfondies, les mouvements de *T.chilensis*, hors des zones endémiques, devraient être évités.

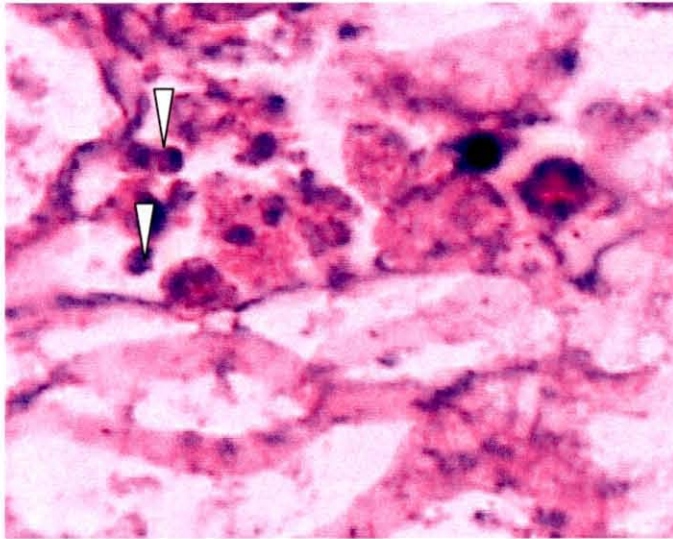
Mikrocytos roughleyi

Nom commun de la maladie :

La maladie australienne d'hiver, la maladie à « Microcell » des huîtres de roche de Sydney.

Nom scientifique ou affiliation taxonomique :

Mikrocytos roughleyi, avec des affinités taxonomiques incertaines.



Observation en microscopie photonique, grossit 2000 fois, de tissus conjonctif d'une huître infectée par *M.roughleyi*. Les flèches mettent en évidence deux de ces parasites, libres dans les tissus.

Distribution géographique :

La Nouvelle-Galles du Sud, l'Australie.

Espèce hôte :

Saccostrea commercialis.

Impacte sur l'hôte :

Une infection intracellulaire systémique des hémocytes est associée à des lésions de type « abcès » dans les branchies. La maladie est associée à des basses températures et des salinités élevées (30-35 ppt). Elle peut détruire jusqu'à 70% des huîtres de roche de Sydney avant leur troisième hiver.

Techniques de diagnostics :

Observations macroscopiques : La maladie se caractérise par des ulcérations et/ou des abcès dans les gonades, le manteau (fréquemment près du muscle adducteur) et les branchies, et par une altération de la contraction du muscle aducteur.

Histologie: Les abcès contiennent les « microcells » dans les hémocytes. Quelques « microcells » ont une vacuole cytoplasmique qui déplace le noyau à la périphérie de la cellule.

Méthodes de contrôle :

Les huîtres des zones infectées (actuel ou historiquement) ne devraient pas être déplacées vers des zones saines de *M.roughleyi*.

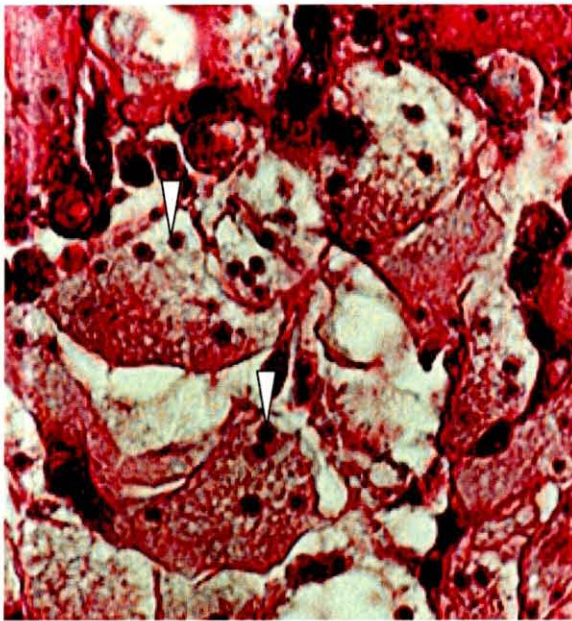
Mikrocytos mackini

Noms communs de la maladie :

La maladie de l'île de Denman, la maladie à Microcell des huîtres du Pacifique.

Nom scientifique ou affiliation taxonomique :

Mikrocytos mackini



Observation en microscopie photonique, grossit 1000 fois, de tissus de la glande digestive d'une huître infectée par *M.mackini*. Les flèches mettent en évidence deux parasites intracellulaires.

Distribution géographique :

Sur la côte occidentale canadienne, probablement omniprésente dans l'ensemble du détroit de la Géorgie et confiné à d'autres localités spécifiques autour de l'île de Vancouver.

Espèces hôtes :

Crassostrea gigas et *Ostrea conchaphila* (= *Ostrea lurida*) sont infectées naturellement ; *Ostrea virginica* et *Ostrea edulis* ont pu être infectées expérimentalement.

Impact sur l'hôte :

Il est possible d'observer une infection intracellulaire des cellules vésiculaires de tissu connectif qui a pour conséquence une infiltration des hémocytes et une nécrose des tissus. Des infections graves semblent être limitées à des huîtres âgées (sur 2 ans) et les mortalités se produisent principalement en avril et mai après une période de 3 à 4 mois où les températures sont en dessous de 10 °C. Approximativement 10% des *C.gigas* infectées semblent survivre et *C.gigas* semble être plus résistante à la maladie que les autres espèces d'huître expérimentalement infectées.

Techniques de diagnostics :

Observations macroscopiques: il est possible d'observer la présence de pustules vertes de plus de 5 millimètres de diamètre, à la surface des palpes labiaux ou du manteau. Souvent une cicatrice brune sur la coquille à côté des abcès est observée à la surface de manteau.

Histologie: un examen en microscopie photonique à fort grossissement (x1000) des cellules vésiculaires du tissu conjonctif immédiatement à côté de l'abcès permet de détecter la présence de parasites intracellulaires de 2 ou 3 µm de diamètre. On a également observé ce parasite dans des cellules musculaires et de temps en temps dans les hémocytes.

Microscopie électronique : La morphologie ultrastructurale est différenciée *M.mackini* des espèces de *Bonamia*; du fait que le nucleosome de *M.mackini* est situé vers le centre du noyau tandis que chez *B.ostreae*, il a un emplacement excentrique, de plus il y a absence de mitochondries chez *M.mackini*.

Méthodes de contrôle :

Les huîtres des zones infectées (actuelles ou historiquement) ne devraient pas être déplacées vers des zones où la maladie n'a pas été observée. L'effet de la maladie sur les populations infectées peut être réduit à un niveau moindre en récoltant ou en déplaçant les huîtres âgées vers des emplacements plus haut dans la zone intertidale avant mars et en ne déplaçant ces huîtres à des niveaux plus bas avant juin.

COMPOSITION DES DIFFERENTS REACTIFS, TAMPONS ET MILIEUX UTILISES

Réactifs pour la PCR (pour la Taq DNA polymerase in storage Buffer B, PROMEGA) :

- Tampon de stockage de la Taq : Tris-HCl 50mM à pH 8.0, KCl 100mM, EDTA 0.1mM, DTT 1mM, glycerol 50%, Tween 20 0.5% et Nonidet-P40 0.5%.
- Tampon de réaction : consensus pour pH de 8.4 par Tris-HCl 10 mM, sel par KCl 50mM, 0.1% de triton 100X.
- MgCl₂ : Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 2.5mM.

Réactifs pour l'extraction plasmidique (pour le Mini Kit plasmid, QIAGEN):

- Tampon P1 (tampon de resuspension) : Tris-Cl 50mM à pH8.0, EDTA 10mM, 100µg/ml de RNase A.
- Tampon P2 (tampon de lyse) : NaOH 200mM, 1% de SDS.
- Tampon P3 (tampon de neutralisation) : Acétate de potassium 3M à pH 5.5.
- Tampon QBT (tampon d'équilibration) : NaCl 750mM, MOPS 50mM à pH 7.0, isopropanol 15% ; Triton 100X 0.15%.
- Tampon QC (tampon de lavage) : NaCl 1M, MOPS 50mM à pH7.0, isopropanol 15%.
- Tampon QF (tampon d'élution) : NaCl 1.25M, Tris-Cl 50mM à pH8.5, isopropanol 15%.
- TE : Tris-Cl 10mM à pH 8.0, EDTA 1mM.

Milieux de culture bactérienne :

- Milieu LB solide : LB Broth base, GIBCO BRL (lennox L agar), 32g par litre d'eau distillée, autoclavé 15 min à 121°C. Plus un antibiotique (en générale de l'ampicilline).
- Milieu LB liquide : LB Broth base, GIBCO BRL (lennox L Broth base), 20g par litre d'eau distillée, autoclavé 15 min à 121°C. Plus un antibiotique (en générale de l'ampicilline).

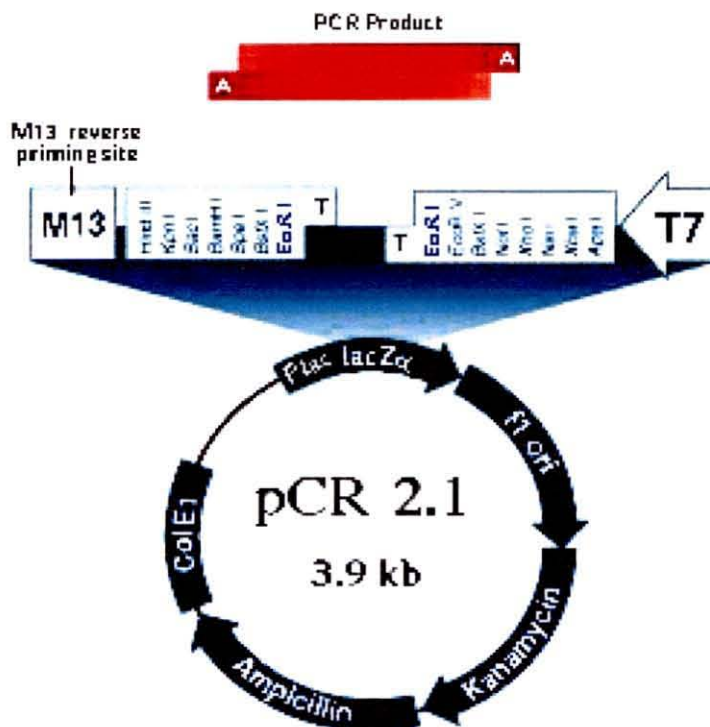
Electrophorèse :

- TAE 1X (liquide de migration) : Tris-acetate 0.04M, EDTA 0.001M.
- Gel d'agarose : gel à 1%, 1g d'agarose pour 100ml de TAE 1X ; gel à 2%, 2g d'agarose pour 100ml de TAE 1X.

PRESENTATION DU KIT DE CLONAGE : TA Cloning Kit, INVITROGEN.

Ligation :

La ligation est effectuée à partir d'un produit de PCR frais, le vecteur utilisé est le plasmide pCR 2.1. Le produit de PCR possède deux extrémités cohésives avec une adénosine libre, le vecteur linéarisé possède les extrémités complémentaires avec une thymine libre. Le plasmide pCR 2.1 possède deux marqueur de résistance à des antibiotiques, l'ampicilline et la kanamycine, il est ouvert au niveau d'un troisième marqueur de sélection, correspondant à un gène codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase (la partie C-terminale étant codé par le génome de la bactérie transformé), qui sera muté lors de l'insertion du produit de PCR, empêchant ainsi la production de la β -galactosidase, et donc la dégradation du X-gal, introduit dans le milieu de culture, et par le fait la coloration des colonies en bleu. Le site d'insertion est entouré de deux sites de restriction pour Eco RI, permettant de libération de l'insert, effectué lors de la dernière vérification avant l'envoi au séquençage.



- Tampon de ligation : Tris-HCl à pH 7.5, MgCl₂ 60mM, NaCl 50mM,

Transformation :

Les bactéries transformées sont les *Echerichia coli* INV α F' compétentes, ne possédant pas de répresseur du promoteur Lac Z α (évitant ainsi l'ajout d'IPTG lors de la mise en culture).

- Milieu de culture SOC : Tryptone 2%, extrait de levure 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, glucose 20 mM.

CARTE DE RESTRICTION DE LA SEQUENCE DE *M. Roughleyi*

Ppu10I NsiI BshNIKpNI XhoII BamHI
 Zsp2I Eco64I Acc65IBstI
 5' AcCB1I BstX2I AcsISexAI
 GCTATGCATCAAGGTTTGGTACCGAGTTGGATCCACTAGTAACGCCCGCCAGTGTGCTGGAATTCAACCT
 CGATACGTAGTTCCAAACCATGGCTCAACCTAGGTGATCATTGCGGGCGGTACACGACCTTAAGTTGGA
 3' EcoT22I Asp718I BstYIAcNI BstXI ApoI
 Mph1103I BanI MflISpeI EcoRI

BpiI NspI AflIII
 BpuAI EcoT22I
 Sum Mph1103I
 GGTTGATCC TGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCCAAGTATAAACACGT
 CCAACTAGGACGGTCATCAGTATACGAACAGAAGTTTCTAATTCGGTACGTACAGGTTCATATTTGTGCA
 FauNDI BbsI Ppu10I NsiI
 NdeI Bbv16II Zsp2I

BstSFI
 SfcI
 PstI
 TTGTA CTGTGAAACTGCAGATGGCTCATTACAACAGTTATAGTTTATTTGACATTGAACTGTTACACGGA
 AACATGACACTTTGACGTCTACCGAGTAATGTTGTCAATATCAAATAAACTGTA ACTTGACAATGTGCCT

EcoT14I
 ErhIAvrII
 StyI BlnI
 TAACCGTAGTAACCTAGGGCTAATACGTGACAAACCCTGCTCGCAGGAGTGCATATTAGCTGAAAACCAA
 ATTGGCATCATTGGATCCCGATT ATGCACTGTTTGGGACGAGCGTCC TCACGTATAATCGACT TT TGGTT
 BssTII
 Eco130I BsaAI

AflIII
 BspLU11I
 SspI NspI
 CTTTGGTTGAATAATAATATTT GTCGGATCGCGTTGGCCTCGCCAGCGACATGTCA TTCAAGTTT CT GAC
 GAAACCAACTTATTATTATAAACAGCCTAGCGCAACCGGAGCGGTCTGCTGTACAGTAAGTTCAAAGACTG

BsmI Kpn2I
 Mva1269I MroI
 CTATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTTTGACGGGTAACGGGGAATGCGGGTTTCGATTC
 GATAGTCGAACTGCCATCCATAACCGGATGGCACCGAAACTGCCATTGCCCTTACGCCAAGCTAAG
 BstDSI
 DsaI BsaMI

BspMI
 BstDSI Acc16I
 DsaI AviII
 CGGAGAGGCAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCACGGGAGGCAGCAGGTGCGCAAATTACCCAATTCTG
 GCCTCT CCG TCGGACTCTTT GC CGATGGTGTAGGTGCCCTCCGTCG TCCACGCG TTTAATGGGTAAAGAC
 FspI

BsiEI
 BspCI
 BstMCI
 ACTCAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATCGGCGGCCTTCGGTTGCCTATTCGGAATGAGAACAATGT
 TGAGTCT CTCCATCACTG TTC TTT ATT GCTAGCCGCCGGAAGCCAACGGATAAGCCTTACTCTTGTTACA
 Ple19IBsaOI
 PvuI Bsh1285I

AcsI MspA1ICfr42I
 ApoI AccBII NspBII KspI
 EcoRI BanI BstDSISacII
 AAAAGCCTTATCGAATTCCAGCGGAGGGCAAGCCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCTAG
 TTT TCGGAATAGCTTAAGGTGCGCT CCCGTT CGGACCACGGTCGTCGGCGCCATTATGGTCGAGGCGATC
 MspAII BshNI DsaI Sfr303I NheI
 NspBII Eco64I SstII PstNHI

Bst1107I Eco88IAma87I
 AclI PspAIAvaI
 Eco32I XmaI BcoIPspALIBsp68I
 CGTATACTAAAGTTGTTGCTGTTAAAACGCCCG TAGTTGGATATCTGCCCCGCCCGGGCCGGACTCGCGA
 GCATATGATTTCAACAACGACAATTTGCGGGCATCAACCTATAGACGGGGCGGGCCCGCCTGAGCGCT
 EcoRV BsoBISmaINruI
 Cfr9ISrfI

BglIXmaIII CfrICfr10IBsiEIBglI Cfr10I MluNI
 BspMI EaeIMroNIBstMCI FseI MseI
 EagINgoAIVBse118INaeI Bse118ICfrI
 CGCACCTGCGCCTGCGGCCGGCCCGGGGCAT AATTCAGGAACGCCGGTCTGGC **CATTTAATTGGTCGG**
 GCGTGGACGCGGACGCCGGCCGGCGGCCCGTATTAAGTCCTTGC GGCCAGACCGGTA AATTAACCAGCC
 EclXINgoMI BsrFIBsaOI BsrFIEaeI BstXI ASspI
 Eco52IBstZIBssAIBsh1285I BssAIBglI Ball

MspAII BmyI Nsil
 NspBII BsiHKA I Zsp2I
 Bsp1286IAlw21I Ppu10I BsaMI
GCCGCTGG TCCTGAT CCTTTACTTTGAGAAAATTAAGTGCTCAAAGCAGGCTCGCGCCTGAATGCATTA
 CGGCGACCAGGACTAGGAAATGAAACTCTTTAATTTACAGAGTT TCGTCCGAGCGCGGACTTACGTAAT
 SduI AspHI BsmI
 Bbv12I Mva1269I

GsuI
 AccBII
 BanI
 GCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCACCCGCACTCGTGGCGGGTGT TTT TGTTGG TT TTGAGCTGGAG
 CGTACCTT ATTATT CTGTGCTGAAGCCGTGGCGGTGAGCACCGCCCAAAAACAACCAAAACTCGACCTC
 BshNI Bsil
 Eco64I BssSI

SYSTEMATIQUE

Alveolata

*Apicomplexa (apicomplexans)

-Coccidia

Eimeriida

Cryptosporidiidae

Cryptosporidium

Cryptosporidium felis

Cryptosporidium muris

Cryptosporidium parvum

Cryptosporidium serpentis

Cryptosporidium wrairi

Eimeriidae

Caryospora

Cyclospora

Eimeria

Isospora

Sarcocystidae

Besnoitia

Frenkelia

Hammondia

Neospora

Sarcocystis

Toxoplasma

Eucoccidiida

Lankesterellidae

-Piroplasmida (Piroplasmids)

Babesiidae

Babesia

Theileriidae

Cytauxzoon

Cytauxzoon felis

Theileria

Theileria sp. China

Unclassified Piroplasmida

*Haplosporida

-Bonamia

Bonamia ostreae

-Haplosporidiidae

Haplosporidium

Haplosporidium costale

Haplosporidium louisiana

Haplosporidium nelsoni

Minchinia

Minchinia teredinis

-Urosporidium

Urosporidium crescens

*Perkinsea

-Perkinsida

Perkinsidae

Les différentes espèces présentées ici, sont les plus proches des parasites étudiés. Les espèces soulignées sont celles qui ont été alignées par le logiciel BLAST. Le genre *Mykrocytos* ne pouvant être placé pour l'instant, n'est pas représenté.

MfeI
BsaWI
AcsI
 TAATGATTGATAGAAACAATTGGGGGTGCTAGTATCGCCGGGCCAGAGGTAAAATTCCTTAAATTCGGTG
 ATTACT AACTATCTT TGTTAACCCCCACGATCATAGCGGCCCGGT CTCCATTTTAAGAAATTAAGGCCAC
MunI
ApoI
BsmI
MvaI269I

AGACTAACTTATGCGGAAGCATTACCAAGCGTGTT TTCTTTAATCAAGAACTAAAGTTGGGGGATCGAA
 TC TGATTGAATACGCCTTCGTAAGTGGTTCGCACAAAAGAAATTAGTTCTTGATTT CAACCCC CTAGCT T
BsaMI
BoAS

Bbv16II
EcoRI
EagIBsiEI
BstIEcl136IIFriOIBbv12IBshNI
BpiI
EclXIBstMCI
AclNIBstX2IEcoICRI
Psp124BIBmyIEco64I
BpuAI
Eco52IBstZISpel
BstYISacIBsiHKAIAIw2II
3'
 GACGATCAGAAGCCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTG
 CTGCT AGTCTTC GGCTTAAGGTCGTGTGACCCGCGGCAATGATCACCTAGGCTCGAGCCATGGTTCGAAC
AcsI
BstXI
XmaIII
CfrIBsaOIMflI
SduIBsp1286IAspHI
5'
BbsI
ApoI
EaeIBsh1285IXhoII
BamHISstI
Eco24IBanII

Alignement des séquences des gènes 18S de *Bonamia ostreae*, *Bonamia* sp et *Microcytos roughleyi*.

Base différentes

- : délétion

Amorces sens

Amorces antisens

Mr : **CAACCTGGTTGATCCTGCC**AGTAGTCATATGCTTGTCTTCAAAGATTAAGCCA
Bo : GATTAAGCCA
Bs : GATTAAGCCA

Mr : TGCATGTCCAAGTATAAACACGTTTGTACTGTGAAACTGCAGATGGCTCATT
Bo : TGCATGTCCAAGTATAAACACGTTTGTACTGTGAAACTGCAGATGGCTCATT
Bs : TGCATGTCCAAGTATAAACACGTTTGTACTGTGAAACTGCAGATGGCTCATT

Mr : CAACAGTTATAGTTTATTTGACATTGAACTGTTACACGGATAACCGTAGTAAC
Bo : TAACAGTTATAGTTTATTTGACATTGAACTGTTACACGGATAACCGTAGTAAC
Bs : CAACAGTTATAGTTTATTTGACATTGAACTGTTACACGGATAACCGTAGTAAC

Mr : CTAGGGCTAATACGTGACAAACCCTGCTC--GCAGGAGTGCATATTAGCTGAAA
Bo : CTAGGGCTAATACGTGACAAACCCTGCCTCGCGGGAGTGCATATTAGCTGAAA
Bs : CTAGGGCTAATACGTGACAAACCCTGCTC--GCGGGAGTGCATATTAGCTGAAA

Mr : ACCAACTTTGGTTGAATAATAATATTTGTCGGATCGCGTTGGCCTCGCCAGCG
Bo : ACCAACTTTGGTTGAATAATAATATTTGTCGGATCGCGTTGGCTTCGCCAGCG
Bs : ACCAACTTTGGTTGAATAATAATATTTGTCGGATCGCGTTGGCCTCGCCAGCG

Mr : ACATGTCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTAC
Bo : ACATGTCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTAC
Bs : ACATGTCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTAC

Mr : CGTGGCTTTGACGGGTAACGGGGAAT**CG**GGGTTTCGATTCCGGAGAGGCAGCC
Bo : CGTGGCTTTGACGG**CTAACGGGGAAACAGGGTTCG**ATTCCGGAGAGGCAGCC
Bs : CGTGGCTTTGACGGGTAACGGGGAAT**CG**GGGTTTCGATTCCGGAGAGGCAGCC

Mr : TGAGAAACGGCTACCACATCCACGGGAGGCAGCAGGTGCGCAAATTACCCAA
Bo : TGAGAAACGGCTACCACATCCACGGGAGGCAGCAGGTGCGCAAATTACCCAA
Bs : TGAGAAACGGCTACCACATCCACGGGAGGCAGCAGGTGCGCAAATTACCCAA

Mr : TTCTGACTCAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACGAT**CGGCGGC**TTC-GGTTG
Bo : TTCTGACTCAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACGAT**ATGCGGCCAAC**GGTTG
Bs : TTCTGACTCAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACGAT**CGGCGGC**TTC-GGTTG

Mr : CCTATTCGGAATGAGAACAATGTAAAA**GC**TTATCGAATTCCAGCGGAGGGC
Bo : C**T**TATTCGGAATGAGAACAATGTAAAA**AC**TTATCGAATTCCAGCGGAGGGC
Bs : CCTATTCGGAATGAGAACAATGTAAAA**GC**TTATCGAATTCCAGCGGAGGGC

Mr : AAGCCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCTAGCGTATACTAAAG
Bo : AAGCCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCTAGCGTATACTAAAG
Bs : AAGCCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCTAGCGTATACTAAAG

Mr : TTGTTGCTGTAAAACGCT**CC**GTAGTTGGATATCTGCCCC-GC - CCGGGCCGG
Bo : TTGTTGCTGTAAAACGCT**TC**GTAGTTGGATATCTGCCCC**CGGG**CCGG**CC**CGG
Bs : TTGTTGCTGTAAAACGCT**TC**GTAGTTGGATATCTGCCCC**CGC** - CCGGGCCGG

Mr : ----- ACTCGCGACGCACCTGCGCCTGCGGCCGGCCCGGGGGCATA
Bo : -- TCGTCCGCGACCGC - ACACACGTGCAGA -GCGGCCGCCCG--GGGGCATA
Bs : ACTCGCCCCGACTCGCGACGCACCTGCGCCTGCGGCCGGCCCGGGGGCATA

ASp1 Bo

Mr : ATTCAGGAACGCCGGTCTGGCCATTTAATTGGTCGGGCCGCTGGTCCTGATCC
Bo : ATTCAGGAACGCCGGTCTGGCCATTTAATTGGTCGGGCCGCTGGTCCTGATCC
Bs : ATTCAGGAACGCCGGTCTGGCCATTTAATTGGTCGGGCCGCTGGTCCTGATCC

Mr : ATCCTTTACTTTGAGAAAATTAAGTGCTCAAAGCAGGCTCGCGCCTGAATGC
Bo : ATCCTTTACTTTGAGAAAATTAAGTGCTCAAAGCAGGCTCGCGCCTGAATGC
Bs : ATCCTTTACTTTGAGAAAATTAAGTGCTCAAAGCAGGCTCGCGCCTGAATGC

Mr : ATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCACCGCCACTCGTGGCGGGTGT
Bo : ATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCGCCGCCTC --- GGCGGTTGT
Bs : ATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCGCCGCCACTCGTGGCGGGTGT

Mr : TTTGTTGGTTTTGAGCTGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGGGGTGCTAG
Bo : TTTGTTGGTTTTGAGCTGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGGGGTGCTAG
Bs : TTTGTTGGTTTTGAGCTGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGGGGTGCTAG

Mr : TATCGCCGGGCCAGAGGTAAAATTCTTTAATTCCGGTGAGACTAACTTATGCG
Bo : TATCGCCGGGCCAGAGGTAAAATTCTTTAATTCCGGTGAGACTAACTTATGCG
Bs : TATCGCCGGGCCAGAGGTAAAATTCTTTAATTCCGGTGAGACTAACTTATGCG

Mr : GAAGCATTACCAAGCGTGTTCCTTTAATCAAGAATAAAGTTGGGGGATCG
Bo : AAAGCATTACCAAGCGTGTTCCTTTAATCAAGAATAAAGTTGGGGGATCG
Bs : AAAGCATTACCAAGCGTGTTCCTTTAATCAAGAATAAAGTTGGGGGATCG

BoAs

Mr : AAGACGATCAGA
Bo : AAGACGATCAGA
Bs : AAGACGATCAGA

Bibliographie

LAUCKNER G., 1983, Diseases of marines animals, volume II, Bivalves to scaphopodia, O Kinne.

LINTS F., 1991, Génétique 3, 3^{ème} édition, Tec et Doc Lavoisier Paris.

ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J D., 1989, Molecular biology of the cell, second edition, Garland Publishing, Inc.

CHENG T C., 1986, General parasitology, second edition, Academy press college division.

GRASSE P., DOUMENC D., 1995, Abrégé de zoologie, 1. Invertébrés, 5^{ème} édition, Masson.

GRASSE P., 1952, Traité de zoologie, Tome I, Phylogénie protozoaire : généralités flagellés, Masson.

GRIFFITHS, MILLER, SUZUKI, LEWONTIN, GELBART, 1997, Introduction à l'analyse génétique, 6^{ème} édition, De Boeck Université.

HERVIO D., 1992, Contribution à l'étude de *Bonamia ostrea* (Asctospora), protozoaire parasite de l'huître *Ostrea Edulis* (Bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite.

MARAMOROSCH K., R E SHOPE, 1975, invetebrate immunity, Academic Press, Inc.

LE ROUX F., Cours de biologie moléculaire.

HAND R E., NELL J A., SMITH I R., MAGUIRE G B., 1998, Studies on triploid oysters in australis. XI. Survival of diploid and triploid sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughleyi)) trough outbreaks of winter mortality caused by *Mikrocytos roughleyi* infestation, Journal of Shellfish Research, vol 17, N° 4, 1129-1135.

PERKINS F O., phylum Haplosporidia, Contribution N° 1507, Virginia intitute of Marine Science, School of Marine Science, The College of William and Mary, Glouster point, VA23062.

FARLEY C A., WOLF P H., AND ELSTON R A., 1988, A long-term study of « microcell » disease in oysters with a description of new genus, *Mikrocytos* (G. N.), and two new speciees, *Mikrocytos mackini* (SP. N.) and *Mikrocytos roughleyi*, Fishery Bulletin : vol 86, N° 3, 581-593

BERTHE F., PERNAS M., ZERABIB M., HAFFNER P., THEBAULT A., FIGUERAS A J., 1998, Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life cycle, Disease of aquatic organisms, vol 34 : 135-144.

LE ROUX F., AUDEMARD C., BARMAUD A., and BERTHE F., 1999, DNA probes as potential tools for the detection of *Martellia refringens*, Marine biotechnologie, 588-597.

BERTHE F J C., LE ROUX F., PEYRETAILLADE E., PEYRET P., RODRGUEZ D., GOUY M. and VIVARES C P., 2000, phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Martellia refringens* validates the existence of phylum Paramyxea (DESPOTES and PERKINS, 1990), Eukaryote microbiologie, 47(3), 288-293.

COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. and GERARD A., 2000, Detection of *bonamia ostreae* based on DNA tools, Journal of Invertebrate Pathology.

Références informatiques :

www.pac.dfo-mpo.gc.ca

www.obs-vlfr.fr, Phylogenie et taxonomie moléculaires.

www.infobiogen.fr : comportant les différents