

**UNIVERSITE DE PERPIGNAN
ECOLE DOCTORALE
Biologie, Environnement et Sciences pour l'ingénieur**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PERPIGNAN

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement

par

AUDEMARD Corinne

Le 7 décembre 2001

**Stratégie d'utilisation de différentes espèces
animales par le parasite *Marteilia refringens*
pour assurer son cycle biologique**

JURY

M. Claude Combes

M. Maurice Héral

M. Benoît Sautour

M. Franck Berthe

M. Gabriele Sorci

M. Gérard Blanchard

M. Henri Grizel

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Remerciements

Au terme de ces quelques années passées entre « pipetman et bottes en caoutchouc », je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à ce travail.

A Claude Combes,
pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse malgré l'éloignement géographique et la part de risque que comportait ce sujet. Merci de votre enthousiasme et de votre passion pour ces parasites. Travailler sous votre direction a été une chance, très sincèrement merci.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génétique et Pathologie de la Tremblade de la Station Ifremer de la Tremblade, dirigée successivement par Jean Pierre Flassch et André Gérard. Je les remercie de m'avoir accueilli dans ce laboratoire.

A Gérard Blanchard, Henri Grizel et Gabriele Sorci
pour votre regard sur ce travail et vos suggestions. De part vos divers domaines de compétences, ce travail ne pourra être qu'enrichi. Je vous en remercie.

A Maurice Héral,
pour sa participation à ce jury de thèse malgré ses nombreuses obligations.

A Franck Berthe,
pathologiste sans frontière, merci de m'avoir donné la chance de travailler sur ce sujet pluridisciplinaire et d'avoir si bien su gérer « les risques » qu'il comportait.

A Frédérique Le Roux,
biologiste moléculaire passionnée, grâce à qui j'ai pu passer des espèces à leur ADN. Mes remerciements dépassent l'aspect scientifique, merci pour ta spontanéité, et ton soutien tout au long de cette aventure.

A Pierre-Guy Sauriau
écologiste n'hésitant jamais à parcourir les estrans vaseux à la recherche de leurs habitants et des liens qui les caractérise, merci de m'avoir permis d'y voir plus clair dans toutes ces questions d'interactions.

A Benoît Sautour,
écologiste du zooplancton, merci pour l'intérêt que tu as montré pour ce
sujet de thèse et pour tes conseils, et mon apprentissage de l'écologie de ce
monde du très petit.

A Christine Coustau,
pour ta vision de parasitologue sur ce sujet et pour tous tes judicieux
conseils.

Merci à l'ensemble du personnel du CREAA,
pour nous avoir fourni notre modèle d'étude et votre aide lors de nos tris
de petites bêtes ou lors de ces fameux ramassages d'algues.

A Jean-Pierre Joly et Yves Pichot pour votre soutien et votre
connaissance de *Marteilia* en dehors de la claire.

A Catherine Collins, qui reste la première chercheuse d'hôtes de *Marteilia* et à
Antoine Barnaud pour avoir planté le décors de cette thèse en étudiant *Marteilia*
chez les huîtres.

A Marie-Céline Sajus, Marion Lucas et Emilie Morin,
qui ont accepté de travailler avec moi sur ce sujet.

A Frédérique Blouin, Emile Planche, Stéphane Bodin, merci pour votre
disponibilité et votre capacité à trouver des réponses à mes questions de
copépodes et d'huîtres.

A Martine Grasset et Florence Rivet, pour la gentillesse et l'efficacité dont vous
savez faire preuve.

Aux spécialistes des petits tracas des huîtres, Nathalie Cochennec, Anne
Thébault et Tristan Renault et aux spécialistes de la génétique, Edouard Bedier,
Pierre Boudry, Helene MacCombie, Sylvie Lapegue. Et merci à Serge Heurtebise
pour avoir maintes fois résolus mes problèmes informatiques, et à Pascal Phelipot
à qui je cède ces petits copépodes.

A l'équipe du laboratoire Conchylicole de Poitou-Charente
ou aux « Mickeys », pour votre faculté à allier science et humour; merci
très sincèrement de la part de... (je préfère vous laisser finir la phrase).

A l'équipe de la DEL
et leur fameuse apparition de midi , merci à Aurélie, Olivier, Kéké, Pascale,
Daniel, John, Maryvonne et le reste de l'équipe.

A Delphine Rousic, un immense merci pour ton accueil, ton soutien durant ces
trois années et ces quelques jours sans fin, et, bien sûr, à toi Arnaud Huvet, pour
tes conseils avertis, et pour avoir tout testé avant moi.

A Isabelle Arzul, pour ta spontanéité, ta sincérité, très, très bonne route à toi
et à Xavier navigateur sur web ou sur eau.

A Christophe Ledu, pour ton écoute, et pour toutes ces petites attentions qui me
sont si précieuses.

A Bruno Chollet pour ta disponibilité, et, pour votre gentillesse, à toi et à
Patricia (qui aura atteint le terme avant moi).

A Raphaël Brizard ce gestionnaire hors norme des huîtres et de leurs
tortionnaires.

A Alexandra Leitaó, et tous ses « trrrrucs » pour redonner du courage.

A Maeva Robert pour nos premiers pas (ou plouf) en planche à voile, à Yohann
Didier, lui aussi attiré par ce mélange eau/vent.

A Mélanie Gay pour sa ténacité et son soutien et à Franck pour sa disponibilité, à
Lionel Degrémont dompteur de chat et pêcheur de truites, et, à la petite
dernière, Karine, à tous les 3, beaucoup de chance pour la suite.

A Florence Cornette, pour sa gentillesse et son soutien, et bon retour chez toi.
Je n'oublie pas Léon Rousic que je remercie pour avoir si gentiment fait la chasse
aux fautes d'orthographes.

Merci à ceux qui sont restés présents au cours de ces 3 années: à Marie et
Philippe , pour votre amitié, à Thomas, Marie et leur petite famille, pour votre
soutien, à Cécile, Laure, Elvire, Loïc, Bertrand, Sophie, et tous ces amis qui
comme moi ont le goût du salé. A Alex pour tous ces souvenirs oléronnaï. A vous
mes amis du nord, et à toi Ben, pour votre amitié et votre compréhension.

Et puis, à ma chère petite famille pour m'avoir tout à la fois soutenue et laissée
libre de suivre ce chemin. Merci aussi d'avoir eu la bonne idée, quelques vingt ans
auparavant, d'étendre vos racines jusqu'à cette île qui va manquer.

Sommaire

Introduction générale	6
------------------------------	----------

Première partie : données bibliographiques	10
---	-----------

I. L'ostréiculture	10
A. Importance économique	10
B. L'ostréiculture française	11
C. L'ostréiculture et les risques zoonosantaires	14
1. L'aspect qualité	15
2. Les prédateurs	16
3. Les compétiteurs	16
4. Les agents pathogènes	17
4.1 La mise au point d'outils de diagnostic de ces agents	18
4.2 Contrôle des transferts de mollusques	18
4.3 Limiter le développement d'une maladie	19
II. <i>Marteilia refringens</i>, parasite de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i>	20
A. L'hôte <i>Ostrea edulis</i>	20
1. Systématique	20
2. Les différentes espèces du genre <i>Ostrea</i>	22
3. Habitat et répartition géographique de <i>Ostrea edulis</i>	22
4. Données biologiques	23
4.1. Nutrition	23
4.2. Systèmes circulatoire et immunitaire	25

B.	<i>Marteilia refringens</i>	26
1.	Historique de la marteiliose	26
2.	Pathogène	27
3.	Phylogénie	27
4.	Taxonomie	31
4.1.	Données ultrastructurales	31
4.1.1.	<i>Marteilia refringens</i>	31
4.1.2.	<i>Marteilia sydneyi</i>	31
4.1.3.	<i>Marteilia maurini</i>	31
4.1.4.	<i>Marteilia lengehi</i> , <i>Marteilia christenseni</i> et <i>Marteilia</i> sp.	32
4.2.	L'apport récent de la biologie moléculaire	32
5.	Cycle de vie	33
5.1.	Cycle de développement au sein de <i>Ostrea edulis</i>	33
5.2.	Influence des paramètres environnementaux	35
5.2.1.	Cycle saisonnier	35
5.2.2.	Répartition géographique	37
5.3.	L'hypothèse du cycle hétéroxène	38
5.3.1.	Les essais de transmission horizontale	38
5.3.2.	Tester l'implication d'hôtes potentiels	39
III.	Problématique de l'étude	40
<hr/>		
	Deuxième partie : Les outils de détection de <i>Marteilia refringens</i>	42
<hr/>		
	Troisième partie : Le modèle d'étude de la marteiliose	55
<hr/>		
	Quatrième partie : Implication de <i>Paracartia grani</i> au sein du cycle de vie de <i>Marteilia refringens</i>	80
<hr/>		

Cinquième partie : Dynamique de <i>Marteilia refringens</i> au sein du modèle claire	106
Sixième partie : discussion générale	131
I. Discussion des résultats obtenus	131
II. « Boucler son cycle est le leitmotiv de la vie des parasites » (Combes, 1995).	133
A. <i>Marteilia refringens</i> chez ces hôtes	133
1. <i>Ostrea edulis</i>	133
1.1. Schéma général	133
1.2. Atteinte du site d'infection	134
1.3. Sporogénèse et phase de multiplication interne	134
1.4. Libération du parasite dans l'environnement	135
2. <i>Paracartia grani</i>	135
2.1. Schéma général	135
2.2. Ségrégation des sexes	137
2.3. Atteinte de l'organe cible	138
2.4. Sortie du site	139
B. Transmission d'un hôte à l'autre	139
1. Transmission de l'huître vers le copépode	140
2. Transmission du copépode vers l'huître	141
C. <i>Marteilia refringens</i> au sein de l'écosystème	144
1. Echelle temporelle	144
2. Echelle spatiale	144
Conclusions et perspectives	146

Bibliographie générale	148
Annexe 1	171
Annexe 2	177

Introduction générale

La production de mollusques bivalves marins représente approximativement 23% de la production mondiale aquacole. En Europe, la consommation de mollusques est en constante augmentation et se base essentiellement sur l'huître creuse japonaise (*Crassostrea gigas*) importée dans les années 70 (Grizel et Héral, 1991) et les moules (*Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*). Le développement et la pérennité de ces productions animales nécessitent d'identifier les facteurs de fragilisation. Il apparaît essentiel 1) de contrôler la qualité du milieu d'élevage et des bivalves eux-mêmes, 2) de préserver un équilibre entre les stocks de mollusques cultivés et la capacité trophique des bassins d'élevage, 3) d'améliorer les performances de production, 4) de prendre en compte la rentabilité et 5) de limiter l'apparition ou le développement de maladies.

Les maladies constituent un risque majeur pour les productions aquacoles. Une maladie peut être définie par un déséquilibre physiologique non compensé par l'animal. Ce déséquilibre peut avoir des conséquences sur la qualité du produit, sur les performances zootechniques, et, dans les cas extrêmes, une maladie peut conduire à la mort de l'animal.

Les facteurs abiotiques et biotiques peuvent être la cause de maladies. Les paramètres environnementaux (la température, la salinité, l'oxygénation, ...) peuvent induire une fragilisation de l'animal lorsqu'ils ne correspondent pas à ses préférences physiologiques. Parmi les facteurs biotiques, un retour sur l'histoire de l'ostréiculture française met en évidence la fragilité de cette production face aux maladies dues à des agents pathogènes.

Ainsi, la production de l'huître plate indigène, *Ostrea edulis*, a vu sa production passer de 30 000 tonnes par an environ dans les années 60, à moins de 1 500 tonnes actuellement suite à l'apparition de 2 épizooties causées par des parasites.

La première de ces maladies est la marteiliose, responsable d'importantes mortalités dès la fin des années 60 (Grizel *et al.*, 1974). L'agent impliqué est un protozoaire parasite *Marteilia refringens* qui se développe au sein de la glande digestive et sera l'objet principal de cette étude. La seconde maladie, la bonamiose, se déclare quelques années après et accentue la chute de production dès le début des années 80 (Comps *et al.*, 1980). Cette maladie est causée par le protozoaire *Bonamia ostreae*, parasite hémocytaire de l'huître plate.

Au même moment, l'huître creuse portugaise, *Crassostrea angulata*, sur laquelle reposent les trois quarts de la l'ostréiculture française disparaît quasiment des côtes françaises suite à l'apparition de la maladie des branchies causée par un iridovirus (Marteil, 1968 ; Comps et Duthoit, 1976 ; Comps, 1988). Une autre huître creuse, *Crassostrea gigas* originaire du Japon, est alors massivement importée au cours des années 70 comme espèce de substitution à l'huître portugaise (Grizel et Héral, 1991).

Face aux risques liés à l'apparition de maladies infectieuses, il apparaît primordial de mettre en œuvre une stratégie permettant d'éviter, ou tout au moins de limiter, l'impact des agents pathogènes. Les moyens de lutte contre ces agents ne peuvent être d'ordre thérapeutique. En effet, à la différence des vertébrés, les mollusques ne produisent pas d'anticorps ce qui rend la vaccination impossible. D'autre part, les substances anti-infectieuses comme les antibiotiques ne peuvent être utilisées en milieu marin ouvert, de part les risques pour l'environnement et les quantités de produit à utiliser.

Les agents pathogènes peuvent être introduits dans une zone d'élevage via les transferts de mollusques. Le protozoaire parasite *Haplosporidium nelsoni* a été introduit sur la côte atlantique des Etats-Unis à l'occasion de transferts de *C. gigas* à partir du Japon (Burreson, 1997). Cet agent a été responsable d'importantes mortalités de l'huître creuse américaine *Crassostrea virginica* dans les années 50-60. En France, les transferts de naissain provenant de Californie sont responsables de l'apparition de la bonamiose (Cigarria et Elston, 1997).

Les risques liés à l'introduction d'agents pathogènes au sein des zones indemnes doivent être gérés afin d'éviter de telles situations. Cette gestion nécessite d'être capable d'identifier de façon spécifique l'agent concerné, autrement dit de disposer d'outils de diagnostic. Les techniques de microscopie sont utilisées en routine dans le cadre de réseaux de surveillance. L'identification spécifique d'un agent pathogène est dépendante de l'expérience de l'utilisateur dans ce domaine. Cependant, dans le cas d'agents ayant une morphologie proche les critères morphologiques peuvent s'avérer insuffisants pour les distinguer.

Face à ces limites, les outils de biologie moléculaire constituent aujourd'hui une nouvelle approche pour l'identification des agents pathogènes. Les avantages de ces techniques sont la spécificité liée à la détection d'une molécule conservée, l'ADN, et la rapidité de la réponse d'identification. Cependant, ces techniques présentent elles aussi des limites constituées par la possibilité de faux résultats positifs et la question de la réalité biologique de ces détections d'ADN. En définitive, une approche polyphasique du diagnostic semble la plus appropriée. Les outils de microscopie mettent en évidence la présence d'un agent au sein d'un animal, et

dans la majeure partie des cas ils permettent son identification. Lorsque ces critères morphologiques s'avèrent insuffisants, les outils de biologie moléculaire peuvent fournir une identification plus précise.

L'application de ces techniques rend possible la distinction entre les zones endémiques et indemnes. Ces données sont primordiales dans le cadre d'une gestion du risque. En effet, elles permettent d'éviter les transferts d'hôtes d'une zone endémique vers une zone indemne.

Dans les zones endémiques où l'hôte et le pathogène sont présents, il est nécessaire de gérer les facteurs pouvant favoriser l'apparition de la maladie causée par cet agent. Le développement d'une maladie chez un hôte est la conséquence d'interactions entre cet hôte et le pathogène, et, plus précisément, d'une interaction entre le système immunitaire de l'hôte et la capacité de l'agent pathogène à se reproduire et se transmettre. De plus, l'hôte, et le pathogène sont sous la dépendance de l'environnement. Cette situation peut être schématisée par le diagramme de Sniezko (Figure 1). La gestion de la maladie nécessite la description des interactions entre ces 3 éléments, hôte, pathogène et environnement, et la mise en évidence des situations favorables à son développement. Ainsi, certains paramètres de l'environnement peuvent fragiliser l'hôte et induire une virulence du pathogène plus importante. Au contraire, des paramètres environnementaux peuvent agir sur l'agent pathogène en limitant sa capacité de transmission et son impact sur l'hôte.

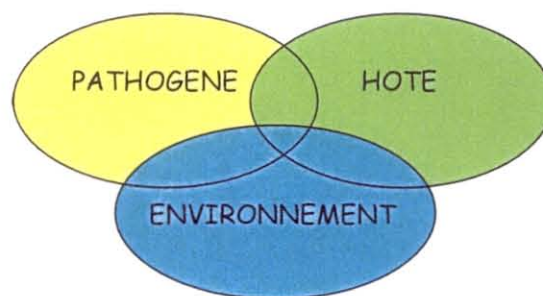


Figure 1: Diagramme de Sniezko

Marteilia refringens, parasite de l'huître plate, est présent à l'état endémique sur les côtes françaises. Sa description et les premières mortalités d'huîtres plates qui lui sont associées datent de la fin des années 60 (Grizel *et al.*, 1974). La gestion des risques liés au développement de la marteiliose nécessite la description des interactions entre *M. refringens*, l'huître et l'environnement. Dans ce cadre, il a pu être montré que ce parasite n'est observé

que dans les baies et les estuaires, et que la période d'infestation des huîtres se limite à la période estivale (Grizel, 1985). Les essais de transmission de ce parasite n'ayant jamais permis d'infecter des huîtres saines, l'hypothèse d'un cycle de vie complexe pouvant impliquer d'autres espèces hôtes (cycle hétéroxène) a été posée (Balouet *et al.*, 1979b ; Grizel, 1985 ; Berthe *et al.*, 1998). Cependant, cette hypothèse n'a jamais pu être démontrée. Ainsi, la gestion du risque est basée sur les observations empiriques de la répartition spatio-temporelle de la maladie, et la culture de l'huître plate n'est possible que dans les zones océaniques (culture en eaux profondes) où le parasite est absent.

Une meilleure connaissance du cycle de *Marteilia* et surtout des interactions existant entre ce parasite et ses hôtes est susceptible d'apporter une amélioration à la gestion actuelle. La mise en évidence des espèces hôtes peut permettre la mise en place de mesures visant à limiter la contamination des huîtres sur la base de données scientifiques et non plus seulement empiriques.

Cette thèse s'intègre au sein de cette problématique et a pour objectif la mise en évidence des compartiments fonctionnels du cycle de *M. refringens*.

Une telle étude nécessite la mise au point d'outils de détection spécifiques de *Marteilia refringens*. Ces outils doivent permettre la détection de ce parasite exclusivement, et ce, quel que soit le stade de développement et l'hôte considéré. Dans ce cadre, les outils basés sur l'observation microscopique ne peuvent être utilisés. En effet, la morphologie du parasite chez d'autres hôtes que *O. edulis*, est inconnue. Les outils de biologie moléculaire ayant pour cible l'ADN de *M. refringens* répondent à cet objectif. En effet, l'ADN est une molécule présentant des zones spécifiques de l'espèce et restant identiques, indépendamment du cycle de développement du parasite.

Par ailleurs, il est fondamental d'effectuer la recherche d'hôtes de *M. refringens* au sein d'un écosystème à biodiversité réduite. En effet, une telle étude n'est pas réalisable au sein d'une zone endémique telle que les baies et les estuaires où plus de 1000 espèces peuvent être présentes (Bodin, 1974 ; Sautour, 1991 ; Montaudouin et Sauriau, 2000). Notre modèle d'étude de la marteiliose est constitué par les claires ostréicoles du Bassin de Marennes-Oléron. Au sein de ces bassins, le cycle de *Marteilia* est fonctionnel (Berthe *et al.*, 1998), et, de part les fortes variations des paramètres environnementaux seul un petit nombre d'espèces y est présent.

Grâce à ces deux atouts, outils de biologie moléculaire et modèle d'étude, nous avons pu mettre en évidence un nouvel hôte de *Marteilia refringens*. Ces résultats seront présentés puis discutés dans une approche fonctionnelle du cycle.

Première partie :

données bibliographiques

I. L'ostréiculture

A. Importance économique

Actuellement, les mollusques représentent approximativement 23% de la production mondiale aquacole. Les bivalves occupent les premiers rangs de cette activité avec les huîtres (36%), les palourdes (23%), les coquilles St Jacques (15%) et les moules (13%). Parmi les huîtres, 90% de la production annuelle mondiale se basent sur *Crassostrea gigas* soit actuellement plus de 3 millions de tonnes (Gouletquer et Héral, 1997).

En France, l'ostréiculture constitue l'essentiel de la production de mollusques. Celle-ci repose principalement sur l'huître creuse *C. gigas* (145 000 tonnes par an) et, dans une moindre mesure, sur l'huître plate *Ostrea edulis* (2 000 tonnes par an). Ces deux espèces représentent respectivement un marché de 1500 et 120 millions de francs par an. L'huître creuse *C. gigas* a été importée massivement sur nos côtes à partir des années 70 suite aux maladies ayant affecté l'huître importée du Portugal au 19^{ème} siècle (*C. angulata*) et l'huître plate indigène. Le succès de cette importation se traduit aujourd'hui par des niveaux de production jamais atteints avec *O. edulis* et *C. angulata*.

L'ostréiculture représente une source d'emplois s'élevant à au moins 20 000 personnes à temps complet et 30 000 à temps partiel (Gouletquer et Héral, 1997). Sur les côtes françaises, les activités conchylicoles occupent 20 000 ha dont 14 000 en zones estuariennes et 6 000 en zone tidale. La culture de *C. gigas* occupe 72% des 60 000 concessions ostréicoles. Dans les années 70, le développement de cette activité a bénéficié d'apports technologiques et du succès de l'importation de l'huître creuse *C. gigas*. Cependant, l'histoire de l'ostréiculture française met en évidence la fragilité de cette production face à la surexploitation des stocks et l'apparition de maladies.

B. L'ostréiculture française

L'huître plate, *Ostrea edulis* est l'huître indigène des côtes européennes. Sa consommation remonte à l'époque des romains. Les huîtres plates de la côte française sont stockées dans des bassins, triées puis expédiées à Rome (Grelon, 1978). Du Moyen-Age jusqu'au 16^{ème} siècle, les bancs naturels sont intensément exploités par ramassage lors des plus basses mers ou par dragage. La découverte de plusieurs milliards de coquilles d'huîtres datant du 10^{ème} siècle témoigne de l'importance de cette activité (Gruet et Prigent, 1986).

Face à cette exploitation intense, les premiers arrêtés visant à limiter les récoltes pendant les périodes de reproduction sont promulgués dès 1750 (Héral, 1989). Les premiers essais de culture d'huîtres plates se développent au sein des bassins des marais salants puis dans des bassins spécialement aménagés, les «claires ostréicoles». Avec le déclin technique et économique des marais salants, ces bassins sont progressivement reconvertis pour la culture de l'huître.

L'ostréiculture moderne est véritablement née à partir du milieu du 19^{ème} siècle grâce à la possibilité de capter le naissain par l'utilisation de collecteurs en bois (Coste, 1861). C'est aussi à cette période que l'Etat prend en charge la gestion des côtes et établit des règles visant à mieux gérer cette activité (Roche, 1897). Malgré ces mesures et la possibilité de capter le naissain, la production d'huîtres plates reste insuffisante par rapport à la demande. Ainsi, en 1857 le gouvernement autorise l'importation d'huîtres creuses *Crassostrea angulata* en provenance du Portugal (Marteil, 1960). L'implantation et la prolifération de cette huître sur les côtes françaises sont généralement associées à l'incident d'un navire marchand le «Morlaisien». En 1868, le mauvais temps obligea le Morlaisien à s'abriter dans l'estuaire de la Gironde et à y rejeter sa cargaison d'huîtres portugaises. Ce sont les huîtres survivantes qui ont rendu possible l'implantation de cette huître sur les côtes françaises.

Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, la production ostréicole s'équilibre entre l'huître plate indigène *Ostrea edulis* et l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (Figure 2). En 1920, l'huître plate est touchée par d'importantes mortalités causées soit par une maladie soit par des conditions thermiques défavorables (Orton, 1924). Sa culture a pu se maintenir en Bretagne, mais dans les autres centres ostréicoles l'ostréiculture s'est développée grâce à l'huître portugaise (Gouletquer et Héral, 1997). Au début des années 60, la production repose

pour la majeure partie sur la culture de l'huître creuse *C. angulata* (85 000 tonnes) et pour une moindre part sur l'huître plate *O. edulis* (28 000 tonnes).

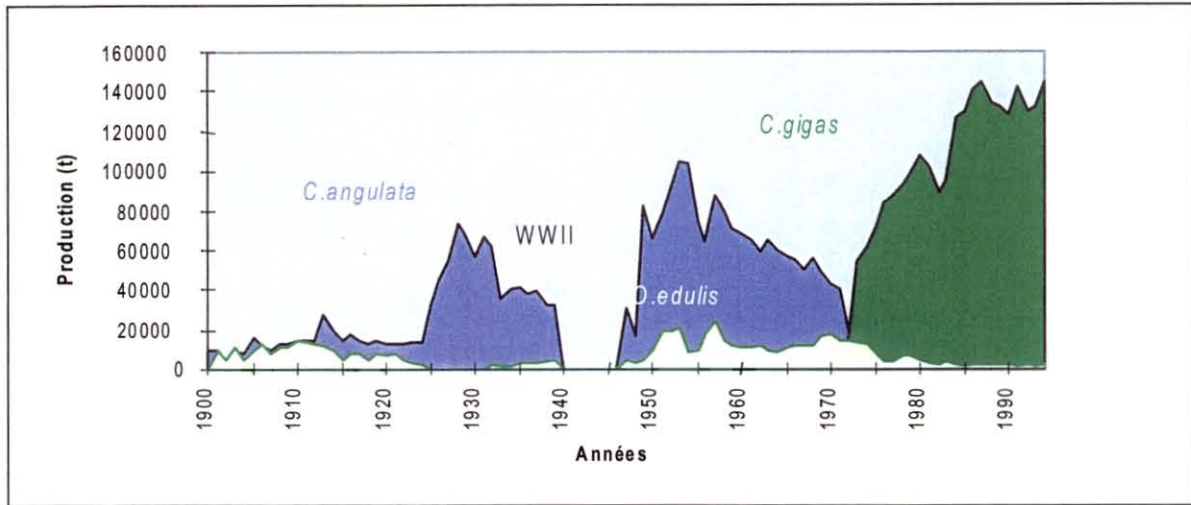


Figure 2 : Production ostréicole en France depuis le début du siècle (d'après Gouletquer et Héral, 1997).

Cependant, au cours des années 60, d'importantes mortalités touchent les élevages de *Crassostrea angulata*. La première vague de mortalités observées à partir de 1966 est attribuée à un iridovirus (Marteil, 1968 ; Comps et Duthoit, 1976). Les origines de ce virus restent encore inconnues et l'hypothèse d'une introduction accidentelle par le biais des importations de *C. gigas* ne peut être exclue. Dès 1970, un second iridovirus très proche du précédent, provoque une seconde vague de mortalités au sein des populations de *C. angulata* subsistantes. Cet épisode aboutit à la quasi-disparition des stocks d'huîtres survivantes de la première épizootie en France et en Espagne (Comps, 1988 ; Elston, 1993). Ainsi, après avoir été surexploitée, *C. angulata* disparaît quasiment de nos côtes au début des années 70.

Parallèlement, à partir de la fin des années 70, l'huître plate est touchée par une première maladie causée par un protozoaire parasite du système digestif, *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974). Cette maladie, appelée marteiliose ou maladie des Abers affecte exclusivement les élevages situés dans les baies et les estuaires et provoque d'importantes mortalités. Au cours des années 70, la production d'huîtres plates passe de 16 000 tonnes par an environ à des tonnages au minimum 2 fois plus faibles (Figure 2).

A partir de 1979, une autre maladie, la bonamiose, provoque d'importantes mortalités au sein des élevages d'huîtres plates. L'agent pathogène responsable de cette maladie est le protozoaire *Bonamia ostreae*, parasite des hémocytes (Pichot *et al.*, 1980 ; Comps *et al.*,

1980). Il est aussi bien observé en zone estuarienne qu'en zone ouverte, et sa transmission aurait lieu toute l'année (Tigé *et al.*, 1981 ; Grizel, 1985). Ce parasite aurait une origine californienne et aurait été introduit en Europe via les transferts de naissain (Elston *et al.*, 1986 ; Grizel, 1997 ; Cigarria et Elston, 1997).

Ces maladies ont engendré des pertes économiques évaluées à 1,6 milliards de francs de chiffres d'affaires et 1,3 milliards de valeur ajoutée entre 1980 et 1983 (Meuriot et Grizel, « e1985). Durant cette même période, environ 20% des emplois générés par l'activité ostréicole ont disparu. Face à la disparition de l'huître portugaise, le maintien de la production ostréicole a été possible grâce à l'importation d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en provenance du Japon. Cette huître, largement exploitée, a permis d'atteindre en France des productions avoisinant les 140 000 tonnes par an (Grizel et Héral, 1991).

Malgré la réussite de l'exploitation de *C. gigas*, la situation de quasi-monoculture représente un risque majeur pour l'ostréiculture. En effet, l'apparition d'une épizootie touchant cette huître pourrait avoir des conséquences dramatiques pour l'ostréiculture. Face à de telles éventualités, le contrôle des transferts apparaît à nouveau fondamental pour maintenir durablement cette production.

Actuellement, la production de l'huître plate a essentiellement lieu en Bretagne (Cancale, Baie de Quiberon) et fournit 1 500 tonnes par an, soit plus de 10 fois moins qu'en 1960. Marteliose et bonamiose ont entraîné d'importantes modifications des pratiques culturelles de *Ostrea edulis* (déplacement des élevages en eau profonde, baisse des densités et de la durée du cycle d'élevage). Cette huître reste très appréciée pour ses qualités gustatives. Son prix de vente dépasse largement celui de l'huître creuse (Figure 3) et les ostréiculteurs restent très demandeurs d'une relance de cette culture en dépit du faible potentiel de production. En effet, le niveau de production de l'huître plate n'a jamais atteint celui de l'huître creuse, portugaise ou japonaise.

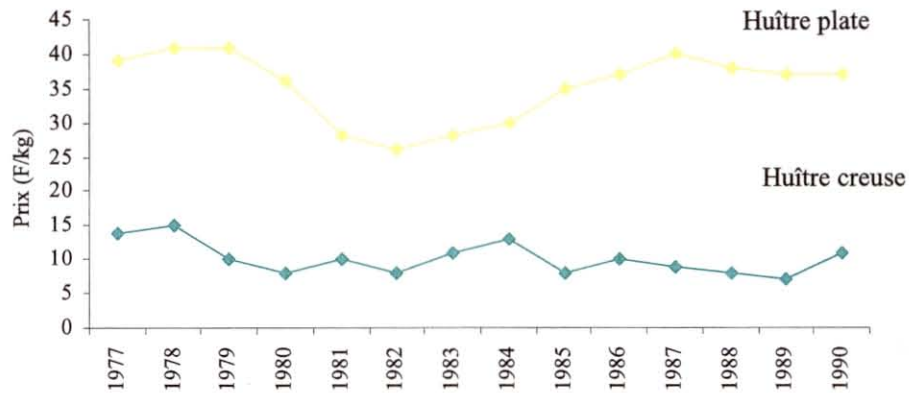


Figure 3 : Evolution du prix du kilo d'huîtres (plates et creuses) au départ des exploitations depuis 20 ans (d'après Launey, 1998).

C. L'ostréiculture et les risques zoonitaires

L'aquaculture est jalonnée par des phases successives de développement de la production et des phases de déclin résultant de la surexploitation des stocks ou de mortalités massives. La pérennité de cette activité nécessite la gestion des facteurs pouvant fragiliser cette production. Dans ce cadre, il faut replacer l'huître au sein de son environnement en interaction avec les facteurs abiotiques (température, salinité, oxygénation, turbidité, nutriments,...) et les facteurs biotiques (qualité et quantité de nourriture, prédateurs, compétiteurs, agents pathogènes...), ces derniers étant également régulés par les facteurs abiotiques (Figure 4).

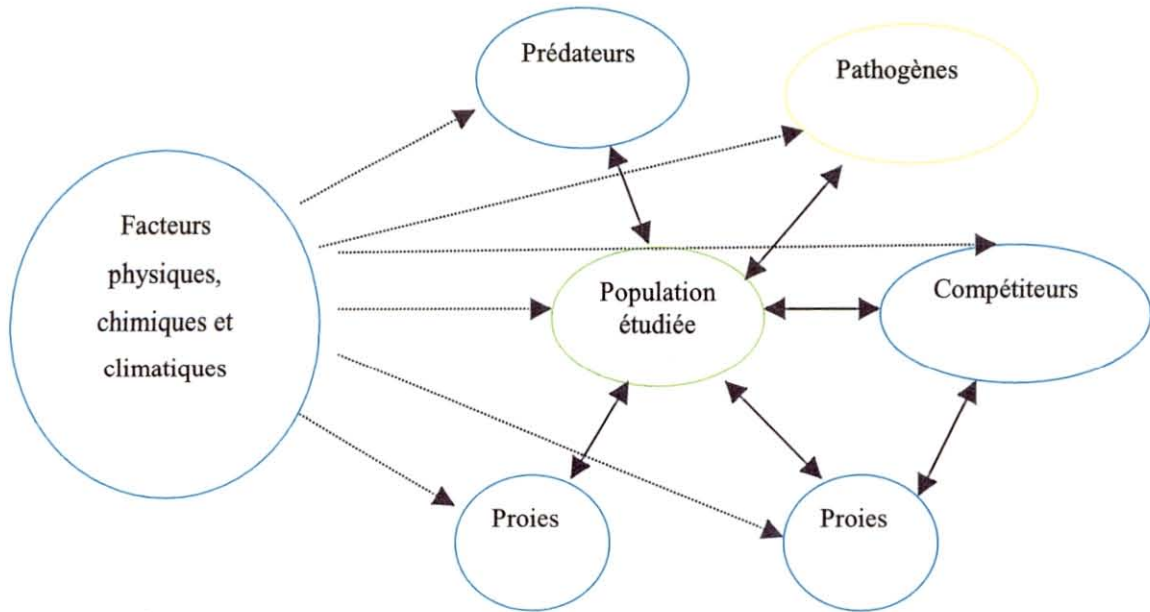


Figure 4: Représentation schématique d'un système écologique et des interactions entre prédateurs et proies, compétiteurs, pathogènes et leur interactions avec les facteurs environnementaux (d'après R. Barbault, 1997).

1. L'aspect qualité

Les huîtres sont des organismes filtreurs et sessiles, particulièrement vulnérables aux pollutions chimiques ou bactériologiques. L'ostréiculture a lieu essentiellement dans les zones estuariennes potentiellement soumises aux rejets anthropiques. Un contrôle de la qualité du milieu et de la qualité des huîtres est donc nécessaire afin d'assurer une production commercialisable, optimale et durable.

La surveillance de la qualité du milieu marin prend en compte les paramètres physico-chimiques et micropolluants, la qualité bactériologique des coquillages, ainsi que le phytoplancton et les phycotoxines. En France, ces suivis sont pris en charge par la Direction de l'Environnement et de l'aménagement du Littoral d'Ifremer. Certains polluants peuvent avoir des effets directs sur les huîtres. Au cours des années 70, des peintures anti-fouling contenant du TBT (tributyle-étain) ont été responsables du mauvais développement des larves d'huîtres creuses du Bassin d'Arcachon (His et Robert, 1980). L'arrêt de l'utilisation de ces peintures a permis la relance du captage de l'huître creuse dans ce bassin.

2. Les prédateurs

Parmi les prédateurs s'inscrivant au sein de l'écosystème de ce mollusque, on peut noter le crabe vert ou *Carcinus maenas*, prédateur du naissain se trouvant sur les collecteurs, les étoiles de mer du genre *Asterias*, les raies (*Myliobatis* sp.) exerçant leur prédation sur les élevages à plat, et parmi les oiseaux, l'huître pie (*Haematopus ostragalus*). Les bigorneaux perceurs de la famille des *Muricidae* sont reconnus comme des prédateurs de l'huître. Les moyens de lutte sont le ramassage à la main ou la protection des élevages tel que cela a été réalisé à Arcachon pour les raies par la mise en place de pieux autour des parcs.

3. Les compétiteurs

Dans une zone d'élevage, il est nécessaire de préserver un équilibre entre les stocks de mollusques cultivés et la capacité trophique de la zone d'élevage considérée (Héral, 1989; Héral *et al.*, 1989). La présence d'espèces compétitrices des huîtres d'élevage sur le plan trophique peut fragiliser cet équilibre. De ce fait, le plus grand compétiteur des huîtres d'élevage est l'huître sauvage, et la gestion de ces bancs apparaît primordiale (Bacher, 1991). Les autres filtreurs (bivalves, ascidies) peuvent entrer en compétition trophique avec les huîtres. Les moules sont aussi considérées comme des compétiteurs trophiques, mais elles auraient surtout une influence sur l'environnement des huîtres en favorisant la sédimentation des matières en suspension. Le mollusque gastéropode *Crepidula fornicata* est considéré comme un compétiteur sur le plan spatial aussi bien que trophique (Chipperfield, 1951 ; Korringa, 1951 ; Walne, 1956 ; Marteil, 1965 ; Jorgensen, 1966 ; Coum, 1979). Ce mollusque est originaire de la côte Est des Etats-Unis et a été accidentellement introduit par le biais des échanges commerciaux. Sa prolifération au sein des bassins ostréicoles est un élément perturbateur de l'ensemble des écosystèmes ostréicoles, ce qui met en évidence les risques que représente l'introduction de nouvelles espèces au sein des écosystèmes (Carlton et Geller, 1993). Dans les bassins ostréicoles français tels que le bassin de Marennes-Oléron, des campagnes de dragage de ce mollusque sont menées régulièrement.

4. Les agents pathogènes

Au regard de l'histoire de l'ostréiculture française, les chutes de production majeures ont été causées par des maladies infectieuses (marteiliose, bonamiose, maladie des branchies). Dans ce cas, les maladies définies comme perturbation physiologique non compensée sont causées par des agents pathogènes. Elles peuvent se traduire au minimum par une baisse des performances zootechniques attendues et, fréquemment par l'apparition d'anomalies du comportement ou de l'intégrité corporelle pouvant aboutir à la mort des sujets atteints.

Les agents susceptibles d'affecter l'aspect de la chair et de la coquille des huîtres constituent un facteur de risque important pour la commercialisation. Parmi les agents responsables de tels impacts on peut citer l'annélide polychète du genre *Polydora*. Ce vers creuse des galeries dans la coquille et la vase qui s'y accumule provoque "le chambrage", affectant directement la qualité du produit. De plus, la défense de l'hôte (sécrétion accrue de calcaire) contre l'invasion est à l'origine d'une dépense d'énergie et de son amaigrissement. Cette fragilisation peut entraîner une moindre capacité de résistance vis-à-vis d'autres agressions biotiques ou abiotiques.

Dans le cas des agents pathogènes pouvant entraîner la mort de leurs hôtes, il est nécessaire de gérer les risques de contamination en contrôlant les transferts de mollusques entre les zones endémiques et les zones indemnes et, au sein des zones endémiques, en limitant le développement des maladies. Les agents majeurs sont notifiés par l'Office International des Epizooties. Ce sont exclusivement des protozoaires parasites responsables d'importantes mortalités au sein des élevages d'huîtres plates *Ostrea edulis* (*Bonamia ostreae*, *Marteilia refringens*), de *Saccostrea commercialis* (*Marteilia sydneyi* et *Mykrocytos roughleyi*), de *Crassostrea virginica* (*Haplosporidium costale* et *H. nelsoni*, *Perkinsus marinus*), de *Crassostrea gigas* et *Ostrea lurida* (*Mikrocytos mackini*), de *Ostrea chilensis*, *O. densalamellosa* et *O. angasi* (*Bonamia exitiosus*) et d'ormeaux, *Haliotis ruber*, *H. cyclobates*, *H. scalaris* et *H. laevigata* (*Perkinsus olseni*).

En pratique, la gestion des risques de contamination par ces agents nécessite 1) l'identification de façon spécifique de ces agents, 2) la détermination des zones indemnes et endémiques, 3) le contrôle des transferts, et 4) au sein d'une zone endémique, la mise en évidence des facteurs pouvant limiter le développement de la maladie.

4.1 La mise au point d'outils de diagnostic de ces agents

La mise en évidence de façon fiable d'un agent pathogène nécessite des outils de diagnostic. Les outils classiquement utilisés sont la microscopie photonique et électronique. Dans le cas d'organismes morphologiquement proches et difficilement discernables d'un point de vue taxonomique, ces techniques ne sont pas suffisantes. La taxonomie moléculaire, basée sur la comparaison de séquence de gènes d'intérêt phylogénétique, permet de préciser l'éloignement ou la proximité de taxons et de mettre en évidence des régions d'ADN spécifiques de taxon. Les outils de biologie moléculaire basés sur la reconnaissance de ces séquences peuvent permettre la détection d'un agent de façon plus précise et plus rapide que les techniques de microscopie.

4.2 Contrôle des transferts de mollusques

Les outils de détection permettent de déterminer les zones géographiques où l'agent pathogène est présent ou absent. Une telle distinction est primordiale pour gérer à l'échelle nationale ou internationale les transferts d'animaux d'une zone à une autre. En France, le Réseau de Pathologie des Mollusques (REPAMO) a pour objet d'assurer le contrôle de l'évolution des épidémies pour les maladies à déclaration obligatoire (bonamiose et marteiliose), la surveillance de base pour l'ensemble du cheptel conchylicole français (espèces exploitées et bancs naturels), l'étude des cas de mortalités anormales, et le contrôle des animaux vivants échangés entre les pays de l'Union Européenne et la France, ainsi qu'avec les pays tiers.

A l'échelle de la France, la culture des huîtres est particulièrement sujette aux transferts. La première phase de cette culture est constituée par le captage des larves planctoniques sur des collecteurs (coquilles, ardoises, tuiles ou tubes PVC). En France, le captage de naissain d'huîtres creuses n'est possible que dans les bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon. Les écloséries fournissent actuellement environ 10% du naissain mis en élevage. Quel que soit le mode d'approvisionnement, l'acheminement de ce naissain dans les différents centres ostréicoles (Bretagne, Normandie, sites méditerranéens) constitue la première cause de transfert. Les méthodes d'élevage de ces huîtres peuvent varier en fonction des sites de production ; élevage en eau profonde, élevage sur estran, à plat ou sur tables après mise en poche des huîtres, ou sur cordes en Méditerranée. La dernière étape de cette culture l'affinage, est aussi source de transferts. Cette dernière étape a pour objet l'amélioration du goût et du poids des huîtres par un séjour sur des parcs situés en zone estuarienne ou au sein de bassins

semi-fermés, les claires ostréicoles dans le bassin de Marennes-Oléron. Enfin, ces huîtres sont placées dans des dégorgeoirs.

A l'échelle internationale, depuis une vingtaine d'années, le développement de l'aquaculture a induit une intensification des introductions et des transferts de mollusques. Actuellement d'après la FAO, cette activité est responsable de 38 % des introductions d'espèces contre 7% pour les introductions accidentelles. Les impacts de ces introductions sont d'ordre écologique car elles sont susceptibles de bouleverser l'équilibre de l'écosystème.

En ce qui concerne les transferts, *Crassostrea gigas* est actuellement le bivalve le plus exporté dans le monde, essentiellement des Etats Unis vers l'Amérique du sud, l'Asie, l'Afrique et l'Europe. L'impact sur l'écosystème peut être négligeable, cependant de tels échanges internationaux sont susceptibles d'introduire un agent pathogène "exotique" dans une zone indemne de cet agent. Ainsi, le parasite *Haplosporidium nelsoni*, pathogène de l'huître creuse *Crassostrea virginica* a été introduit aux Etats-Unis par le biais des transferts d'huîtres *C. gigas* en provenance du Japon (Burresson, 1997). Ce parasite n'affecte pas *C. gigas* mais il est responsable d'importantes mortalités au sein des élevages de *C. virginica*. Le parasite de l'huître plate, *Bonamia ostreae* a été introduit en France via les transferts de naissain d'huîtres plates provenant de Californie (Cigarria et Elston, 1997). D'une manière générale, l'introduction d'espèces non indigènes au sein d'un écosystème représente un risque pour l'équilibre de ce dernier. La gestion et le contrôle de ces transferts sont donc primordiaux pour maintenir une production ostréicole et le milieu environnant.

4.3 Limiter le développement d'une maladie

Au sein des zones endémiques, il ne s'agit pas d'éradiquer l'agent pathogène, mais de limiter l'apparition de la maladie dont il est responsable. En effet, la vaccination telle qu'elle est envisagée chez les vertébrés et l'utilisation de substances anti-infectieuses ne sont pas réalisables de part leur impact potentiel sur l'environnement. Le développement d'une maladie chez un hôte est la conséquence d'interactions entre cet hôte et le pathogène, et, plus précisément d'une interaction entre le système immunitaire de l'hôte et la virulence de l'agent pathogène. Cet hôte, ce pathogène et leurs interactions sont sous la dépendance du milieu dans lequel ils se trouvent. Avant de limiter le développement d'une maladie il est donc nécessaire de décrire l'ensemble de ces interactions. La gestion du risque se traduira par des pratiques culturelles pour lesquelles les facteurs favorisant le développement de la maladie sont limités.

Dans le cas où ces interactions n'ont pu être que partiellement décrites, la gestion des risques de contamination est limitée. La gestion de la marteiliose au sein des zones endémiques est confrontée à cette problématique. En effet, le mode de transmission de ce parasite n'a pu être mis en évidence. L'hypothèse de l'existence d'un cycle hétéroxène a été posée mais n'a jamais pu être démontrée. Une meilleure connaissance du cycle de vie de *M. refringens* est donc primordiale.

II. *Marteilia refringens*, parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*

Marteilia refringens est un protozoaire parasite extracellulaire de la glande digestive de l'huître plate *Ostrea edulis*. Les premières observations de ce parasite datent de la fin des années 60. C'est en effet à partir de cette période que ce parasite fut associé aux importantes mortalités touchant les élevages d'huîtres plates situés exclusivement en baies et estuaires (Grizel et al., 1974).

A. L'hôte *Ostrea edulis*

1. Systématique

L'espèce *Ostrea edulis* (Linné, 1758) appartient à l'embranchement des Mollusques (Tableau 1, Figure 5), à la classe des Bivalves ou Lamellibranches, à l'ordre des Filibranches et à la famille des *Ostreidae* (Grassé, 1960).

La famille des *Ostreidae* compte 5 genres; le genre *Ostrea*, et les genres *Crassostrea* (Sacco, 1897), *Saccostrea* (Dollfus et Dautzenberg, 1920), *Pycnodonta* (Fischer de Waldheim, 1835) et *Tiostrea* (Chanley et Dinamani, 1980).

Cependant, la taxonomie des huîtres a été remaniée plusieurs fois depuis les premières descriptions de Linné (1758) et de Lamarck (1801). Cette évolution est le résultat des choix des critères de classification. Après les critères morphologiques et ceux liés à la biologie des espèces et à l'embryologie, l'étude de la structure des chromosomes, des protéines et de l'ADN, représente désormais une nouvelle approche de la taxonomie des espèces. Ainsi, le

genre *Ostrea* qui actuellement comporte trente-quatre espèces et une vingtaine de taxons apparaissant occasionnellement dans la littérature, reste susceptible d'évoluer.



Figure 5 : Dessin d'une valve droite *Ostrea edulis*.

Tableau 1: Position systématique et particularités morphologiques de *Ostrea edulis*

Embranchement	Mollusque
Classe	Bivalve ou Lamellibranche
Ordre	Filibranche
Famille	<i>Ostreidae</i>
Genre	<i>Ostrea</i>
Espèce	<i>Edulis</i>
Origine	Côte Atlantique européenne
Coquille	Valve gauche bombée Bord des valves plissé et feuilleté
Charnière	Présence de nombreuses petites dents latérales
Fécondation	Interne
Reproduction	Espèce hermaphrodite consécutive Changement de sexe soit annuellement soit au cours d'une même saison

2. Les différentes espèces du genre *Ostrea*

Le genre *Ostrea* est largement réparti sur l'ensemble des côtes et plus particulièrement dans les eaux chaudes et tempérées. Mis à part *O. edulis*, ce genre comporte des espèces pouvant présenter un intérêt économique.

Ostrea puelchana (d'Orbigny) est observée sur la côte atlantique sud-américaine et notamment en Argentine. *Ostrea chilensis* (désormais *Tiostrea chilensis*) est observée sur les côtes du Chili ainsi qu'en Nouvelle-Zélande et Australie. *Ostrea angasi* (Sowerby) est observée sur les côtes du Pacifique sud (Australie, Nouvelle-Zélande, Ile Maurice, Singapour, Philippines) et est exploitée en Australie. Pour *Ostrea folium* (Linné) observée du Maroc au Gabon ainsi qu'en Australie, Malaisie et Inde, des cultures expérimentales ont été réalisées en Malaisie. En revanche, l'exploitation de *Ostrea densalamellosa* (Lischke), initialement présente en Chine, Corée et Japon, est aujourd'hui limitée par l'appauvrissement du stock.

D'autres espèces, de moindre intérêt commercial, sont observées le long de la côte pacifique américaine, *Ostrea lurida* (Carpenter), le long de la côte atlantique américaine, *Ostrea permollis* (Sowerby), et sur les côtes sud-méditerranéennes et africaines, *Ostrea stentina* (Payraudeau).

3. Habitat et répartition géographique de *Ostrea edulis*

Ostrea edulis est un bivalve sessile à distribution plutôt subtidale. L'huître plate peut être observée vers l'amont des cours d'eau ou de bassins à faible débit mais se retrouve plus en aval lorsque les apports d'eau douce et la turbidité sont trop importants. En zone intertidale, son développement est limité par des températures trop élevées ou trop basses (Ranson, 1943). Néanmoins, l'ostréiculture a conduit au déplacement d'huîtres plates de la zone subtidale vers la zone intertidale, plus facile à exploiter.

Ostrea edulis est l'huître indigène des côtes européennes (Figure 6). Elle est observée de la Norvège jusqu'à la baie d'Agadir au Maroc, en passant par le pourtour méditerranéen, en France, Italie, Sicile, Maroc et Tunisie mais aussi en Adriatique et en Mer Noire (Ranson, 1967 ; Marteil, 1976 ; Jaziri, 1990 ; Launey, 1998). Pour des raisons commerciales, elle a aussi été introduite aux Etats-Unis et au Canada (Newkirk et Haley, 1982 ; Elston *et al.*, 1986).

En ce qui concerne l'origine de *Ostrea edulis*, plusieurs hypothèses ont été posées. Cette espèce aurait une origine soit atlantique (Ranson, 1948 ; Trochon, 1976), méditerranéenne avec reconstitution des gisements atlantiques actuels à partir des populations méditerranéennes (Jaziri, 1990) ou enfin, après une séparation des populations européennes en deux stocks, atlantique et méditerranéen pendant le quaternaire, une entrée en contact aurait eu lieu au cours du secondaire (Saavedra *et al.*, 1995).



Figure 6 : Répartition géographique de *Ostrea edulis* (d'après Launey, 1998).

4. Données biologiques

4.1. Nutrition

Les huîtres sont des organismes filtreurs. La filtration résulte du mouvement ciliaire des branchies qui ont deux fonctions : la respiration et le ravitaillement alimentaire. L'activité ciliaire dépend des besoins énergétiques et des facteurs physico-chimiques tels que la température, la salinité, le pH et le taux d'oxygène dissout (Marteil, 1960). Le volume filtré résultant de cette activité, peut dépasser les 10 litres par heure (Collier, 1959).

Le mouvement ciliaire des branchies crée un courant qui permet le transport de la nourriture jusqu'aux palpes labiaux qui rejettent sous forme de pseudo-fèces les particules de trop grande taille ou de moindre qualité (Galtsoff, 1964 ; Raimbault, 1966). Néanmoins, l'analyse des contenus stomacaux des huîtres plates montre une grande diversité des aliments ingérés (Marteil, 1960). La nourriture végétale est majoritaire (organismes phytoplanctoniques ou benthiques, détritus végétaux notamment d'algues multicellulaires), cependant il faut noter qu'une part de la nourriture est d'origine animale. Cette part est constituée de tintinnides, de stades larvaires (copépodes, annélides, lamellibranches, gastéropodes) et surtout de petits copépodes (*Oncaea media*, *Oithona nana*, Harpacticoïdes).

L'ensemble des aliments pénètrent à l'intérieur de la bouche à laquelle fait suite un court œsophage cilié intérieurement puis l'estomac entouré et communiquant avec les diverticules digestifs de la glande digestive ou hépto-pancréas (Figure 7).

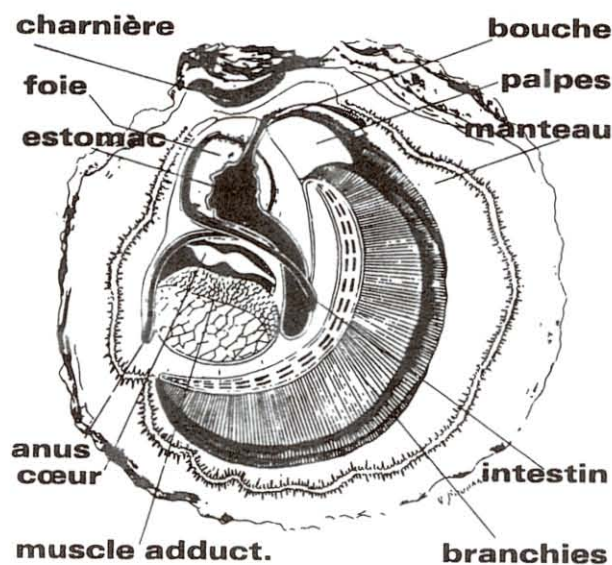


Figure 7 : Principaux organes de l'huître plate *Ostrea edulis*.

La digestion stomacale extracellulaire est assurée par des enzymes (en particulier des amylases) provenant de la dissolution du stylet cristallin se trouvant dans l'estomac (Lubet, 1978). A ce niveau, un second tri s'opère puisque seuls les éléments les plus fins sont entraînés dans les tubules des diverticules digestifs. Une circulation en sens inverse entraînerait les déchets vers l'intestin (Figure 8).

L'essentiel de l'absorption se ferait au niveau des cellules digestives des tubules de la glande digestive. La présence de nombreuses enzymes dans la lumière des tubules digestifs serait en

faveur d'un processus de digestion extracellulaire, mais il existe également des processus de digestion intracellulaire (pinocytose et phagocytose) par les cellules digestives.

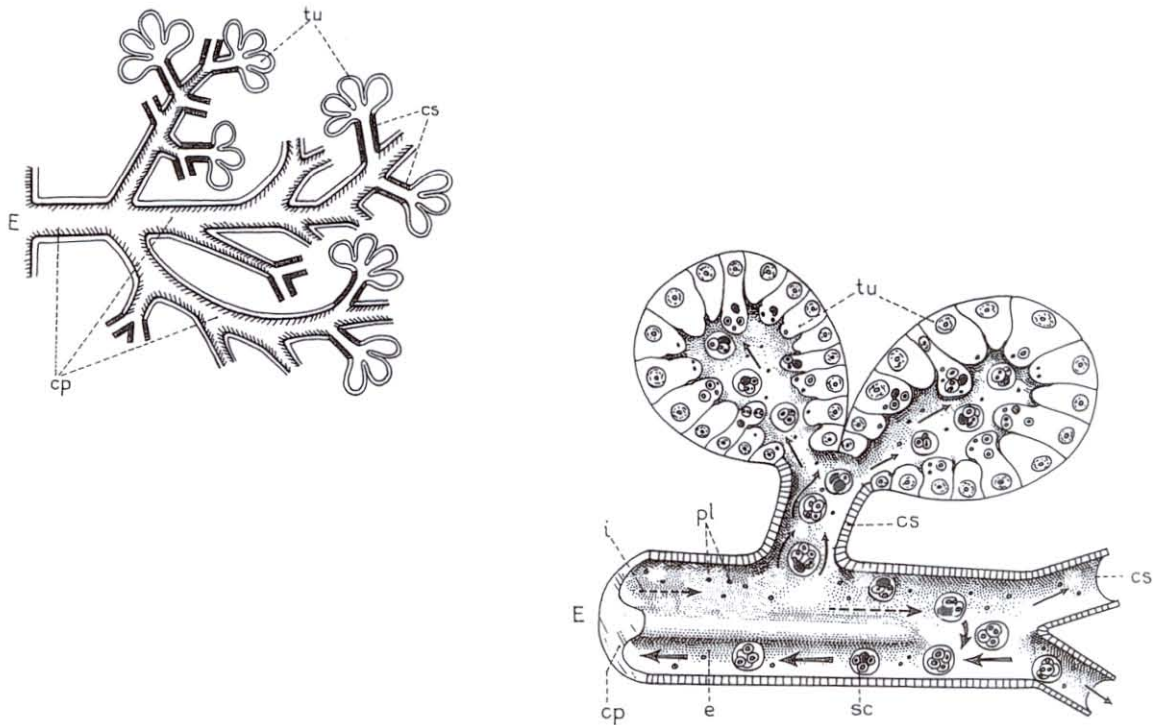


Figure 8: Schémas de la structure et du fonctionnement des diverticules digestifs de la glande digestive des bivalves (Grassé, 1960). (cp et cs : conduits principaux et secondaires ; e et i : portions exhalantes et inhalantes des conduits principaux ; E : estomac ; pl : particules libres ; sc : sphères d'excrétion ; tu : tubules digestifs).

4.2. Systèmes circulatoire et immunitaire

Le système circulatoire est un système semi-ouvert. Les cellules circulantes sont des hémocytes de différents types (agranulocytes, granulocytes, hyalinocytes).

L'huître ne comporterait pas de système immunitaire spécifique, ou tout au moins de système immunitaire faisant intervenir des cellules de type lymphocyte T ou B. Les mécanismes de défense observés reposent essentiellement sur l'activité phagocytaire des hémocytes (Fisher, 1986 ; Cheng, 1996). Ces hémocytes peuvent aussi libérer des enzymes hydrolytiques et des substances cytotoxiques (Cheng, 1983 ; Hubert *et al.*, 1996 ; Roch *et al.*, 1996).

B. *Marteilia refringens*

1. Historique de la marteiliose

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

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

Parallèlement, en 1968, un nouveau protozoaire est mis en évidence chez l'huître *Saccostrea* [*Crassostrea*] *glomerata* [*commercialis*] sur la côte Est de l'Australie, (Wolf, 1972). Ce parasite, *Marteilia sydneyi*, décrit par Perkins et Wolf (1976) a été classé au sein du même genre que *M. refringens*, de part leurs importantes similarités (infection de la glande digestive, cellules se développant par une série de divisions endogènes...).

Le début des années 70, est marqué par l'expansion progressive de la marteiliose vers la majeure partie des centres ostréicoles français et espagnols. Cette expansion pourrait avoir été accentuée par les transferts non contrôlés de lots d'huîtres plates infestées.

La présence du parasite est notée en Bretagne nord, dans l'estuaire de la Penzé dès 1973, l'estuaire de Morlaix dès 1974, puis dès 1975, à Paimpol et à Binic, et dans le golfe du

Morbihan en Bretagne sud. Les centres de Marennes et Arcachon sont également touchés. Les centres espagnols de Galice présentent des taux d'infection supérieurs à 80% (Alderman, 1979). En contre partie, des lots d'huîtres plates provenant de Bretagne et exportés vers la Hollande, ne subissent pas de mortalités anormales (Alderman, 1979 ; Van Banning, 1979). Dans les années 70, les sites méditerranéens semblent être moins favorables au développement de la maladie (Comps, 1979).

Actuellement, la marteillose est encore présente de façon endémique dans de nombreux sites de la Bretagne nord à la Grèce. Les centres ostréicoles des côtes atlantiques françaises et espagnoles (golfe du Morbihan, Marennes-Oléron, Arcachon, Galice, Méditerranée) restent des zones endémiques. L'étang de Thau de la côte méditerranéenne française, présente actuellement des prévalences pouvant atteindre plus de 80%, ce qui constitue les prévalences les plus élevées sur l'ensemble des sites ostréicoles français.

2. Pathogénie

L'examen d'huîtres plates parasitées par *Marteilia refringens* met en évidence l'absence de croissance des huîtres ainsi que leur maigreur et une masse viscérale anormalement décolorée en jaune pâle. En 1970, Comps met en évidence une altération tissulaire essentiellement au niveau des branchies, des palpes et de l'ensemble du tractus digestif.

L'infestation par *M. refringens* conduit dans la plupart des cas à la mort de l'huître (Grizel *et al.*, 1974). L'action pathogène du parasite pourrait s'effectuer selon trois processus ou par leur action conjuguée : 1) le parasite évolue au dépens des cellules épithéliales et limite l'activité métabolique en perturbant les fonctions digestives, 2) le parasite a une action mécanique par obturation des canaux digestifs lors de sa libération au sein des diverticules digestifs ou 3) le parasite sécrète des substances toxiques (Grizel *et al.*, 1974).

3. Phylogénie

La position phylogénique de *Marteilia refringens* a été remaniée plusieurs fois depuis sa description. Les diverses tentatives pour rapprocher *Marteilia refringens* de parasites connus sont toutes restées insatisfaisantes et ont conduit à la création d'un nouveau phylum regroupant ce parasite et d'autres parasites d'invertébrés marins.

Dans les années 70, la description de ce parasite est basée sur des techniques d'histologie et de microscopie électronique. Sur la base des critères ultrastructuraux et de spécificité d'hôtes, plusieurs espèces de parasites du genre *Marteilia* sont décrites.

Marteilia refringens a tout d'abord été rapproché des Haplosporidies, de part la mise en évidence d'haplosporosomes dans la cellule primaire et dans le sporoplasme externe par Comps (1970) puis par Perkins (1976). Son rapprochement avec des champignons primitifs est aussi formulé par Herrbach (1971) puis par Grizel *et al.* (1974). Ces auteurs définissent un nouveau genre, le genre *Marteilia* et une nouvelle espèce, *refringens*, pour ce parasite.

Un autre parasite, *Marteilia sydneyi* chez l'huître *Saccostrea glomerata* de la côte est de l'Australie, est rapproché de *M. refringens* de part leurs similitudes morphologiques et le cycle de développement au sein de la glande digestive (Perkins et Wolf, 1976).

Sprague (1979) crée le phylum des Ascetospora regroupant des protozoaires parasites comme les Haplosporidies ainsi que les organismes nouvellement décrits appartenant aux genres *Marteilia* et *Paramarteilia*, parasite du crustacé *Orchestia gammarellus* (Ginsburger-Vogel *et al.*, 1976 ; Ginsburger-Vogel et Desportes, 1979).

Ce phylum est divisé en deux classes ; les Stelatosporea et les Paramyxea (Encadré 1). Les organismes appartenant à la classe des Stelatosporea sont caractérisés par la présence d'haplosporosomes et de spores comprenant un ou plusieurs sporoplasmes et comportent les haplosporidies typiques. Les genres *Marteilia* et *Paramarteilia* sont placés au sein de la classe des Paramyxea, dans l'ordre des Marteliidae. Au sein de cette même classe, l'espèce *Paramyxa paradoxa* (Chatton, 1911), parasite des larves de l'annélide *Poecilochaetus serpens* est placée dans l'ordre des Paramyxida.

Récemment, Desportes et Perkins (1990), ont proposé de rehausser la classe des Paramyxea au rang de phylum regroupant des parasites d'invertébrés marins (Encadré 2). En plus des genres *Marteilia*, *Paramarteilia*, et *Paramyxa*, ce phylum comprend aussi les parasites du genre *Martelioides*. Ce genre comprend 2 espèces, *M. chungmensis*, parasite observé au Japon et en Corée chez l'huître *Crassostrea gigas* (Comps *et al.*, 1986) et *M. branchialis*, parasite observé en Australie chez l'huître *Saccostrea glomerata* et *Saccostrea cuculata* (Anderson et Lester, 1992).

Encadré 1 : Phylum des Ascetospora Sprague 1979 repris par Desportes (1981)

Phylum des Ascetospora (Sprague 1979)

Classe 1. Stellatosporea (Sprague 1979)

Spores unicellulaires à ouverture apicale, issue de la fragmentation d'un plasmode.

Ordre: Balanosporida Sprague 1979 (=Haplosporidea)

Minchinia

Haplosporidium

Urosporidium

Classe 2. Paramyxea (Levine *et al.*, 1980)

Spores à cellules emboîtées produites par bourgeonnement endogène dans une cellule souche.

Ordre 1 : Marteilida (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977)

Marteilia (parasite de mollusque bivalve)

Paramarteilia parasite du crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (Ginsburger-Vogel *et al.*, 1976)

Ordre 2. Paramyxida Chatton 1911

(Se distingue par le bourgeonnement exogène d'une cellule sporale supplémentaire interprétée comme un processus de réduction chromatique.)

Paramyxa paradoxa parasite des larves de l'annélide *Poecilochaetus serpens* (Desportes, 1981; Desportes et Lom, 1981).

Encadré 2: Phylum Paramyxea revu par Desportes et Perkins (1990) et confirmé par Berthe *et al.* (2000).

Phylum Paramyxea

Parasites d'invertébrés marins caractérisés par une sporulation résultant d'une série de divisions internes au sien d'une cellule primaire améboïde issue de spores dans les tissus de leurs hôtes.

Classe Marteilidae (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977)

Marteilia (Grizel *et al.*, 1974) Perkins, 1976, parasites extracellulaires de bivalves marins

Paramarteilia, Ginsburger-Vogel et Desportes, 1979, parasites de crustacé amphipode marin

Marteilioides, (Comps *et al.*, 1986) Anderson et Lester, 1992, parasites de bivalves marins

Classe Paramyxidea (Chatton, 1911)

Paramyxa, parasite d'annélide polychète

L'obtention de la séquence du gène 18S (codant pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique) de *Marteilia refringens* a permis de confirmer l'appartenance de ce parasite à un phylum indépendant, celui des Paramyxea, différent des Myxosporidies et Haplosporidies (Berthe *et al.*, 2000).

La séquence 18S à *Marteilia refringens* (longue branche de l'arbre) indique une origine très ancienne de ce parasite (Figure 9). Cependant, il pourrait aussi s'agir d'un artefact du à un taux de mutation du gène 18S plus élevé que les chez les autres organismes (Peyretailade *et al.*, 1998 ; Stiller et Hall, 1999). Le séquençage d'un seul gène s'avère donc insuffisant pour positionner avec précision le phylum des Paramyxea au sein d'un arbre phylogénétique. Ce résultat nécessite donc d'être confirmé par le séquençage d'autres gènes de *M. refringens* et par le séquençage de gènes d'autres espèces de ce phylum.

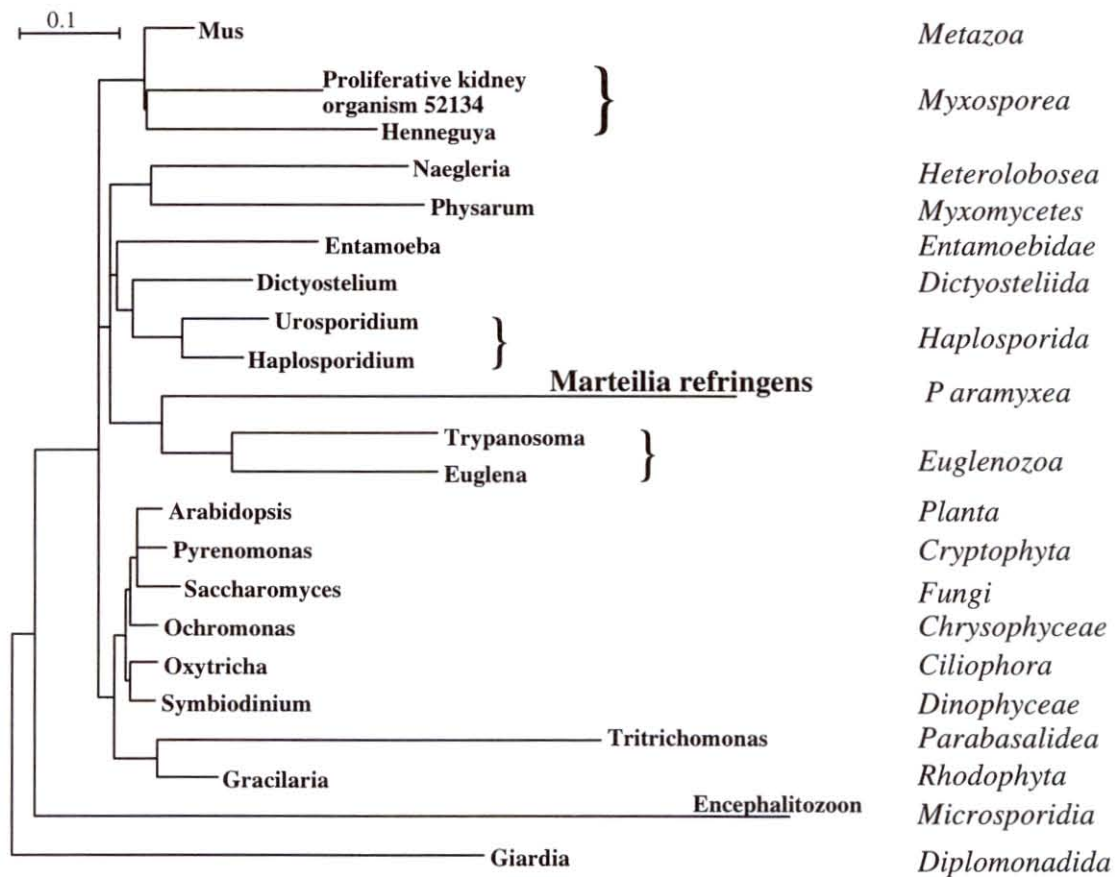


Figure 9 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences du gène 18S de 50 espèces eucaryotes dont *Marteilia refringens* (Berthe *et al.*, 2000)

4. Taxonomie

4.1. Données ultrastructurales

Les premières descriptions des parasites du genre *Marteilia* sont basées sur des études de microscopie photonique puis électronique. Différentes espèces ont été décrites sur la base de différences morphologiques et des espèces hôtes chez lequel le parasite était observé.

4.1.1. *Marteilia refringens*

Marteilia refringens parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*, a aussi été observé chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* (Tigé et Rabouin, 1976). Le développement du parasite est tout à fait similaire à ce qui est observé chez *O. edulis* (localisation dans la glande digestive, sporulation...) mais pour le moment cette infection chez les moules n'a jamais été associée à des épisodes de mortalités (Figueras *et al.*, 1991 ; Villalba *et al.*, 1993 ; Fuentes *et al.*, 1995 ; Robledo et Figueras, 1995). En ce qui concerne l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des pseudoplasmodies ont été mis en évidence par Cahour (1979) mais ils n'évolueraient pas vers des sporanges (Balouet *et al.*, 1979b) et l'espèce est considérée comme un cul de sac parasitaire.

4.1.2. *Marteilia sydneyi*

Situé aux antipodes de *Marteilia refringens*, sur la côte sud-est de l'Australie, *Marteilia sydneyi* est reconnu comme un dangereux pathogène pour l'huître "Sydney Rock Oyster" *Saccostrea glomerata* (Perkins et Wolf, 1976). Ce parasite, responsable de la maladie QX, a causé d'importantes mortalités au sein des élevages (jusqu'à 90% de pertes).

4.1.3. *Marteilia maurini*

En Europe, une autre espèce, *Marteilia maurini* a été décrite chez des moules *Mytilus galloprovincialis* provenant de la lagune de Venise (Comps *et al.*, 1982), puis chez des moules *Mytilus edulis* des côtes françaises (Auffret et Poder, 1983). Il a alors été proposé que *M. refringens* était le parasite de l'huître plate et *M. maurini* celui des moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

4.1.4. *Marteilia lengehi*, *Marteilia christenseni* et *Marteilia* sp.

De façon plus ponctuelle, plusieurs autres espèces de *Marteilia* ont été décrites chez des bivalves marins. De part certaines particularités ultrastructurales et les hôtes chez lesquelles ils ont été décrits, ces parasites ont été considérés comme des espèces différentes.

Marteilia lengehi a été décrite chez des huîtres *Saccostrea cucullata* du Golfe Persique (Comps, 1976).

Marteilia christenseni a été décrite chez la scrobiculaire *Scrobicularia piperata* échantillonnée en Charente Maritime (Ronce les Bains) (Comps, 1983).

Marteilia sp. a été observée en Europe, chez les palourdes *Tapes decussatus*, *Tapes rhomboïdes* et *Tapes pullastra* (Auffret et Poder, 1987; Villalba *et al.*, 1993), la coque *Cerastoderma edule* (Comps *et al.*, 1975), *Modiolus modiolus* (Auffret et Poder, 1983) et *Crassostrea virginica* (Renault *et al.*, 1995).

4.2. L'apport récent de la biologie moléculaire

Sur la base des séquences de la petite sous-unité ribosomale de parasites *Marteilia* purifiés à partir d'huîtres *Ostrea edulis* et de moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*, de différentes régions géographiques, ces parasites ne peuvent être distingués (Berthe *et al.*, 2000). D'autre part, Longshaw *et al.* (2001) ont montré que les critères ultrastructuraux utilisés jusqu'alors pour différencier *M. refringens* de *M. maurini* sont insuffisants car trop variables.

Ces résultats vont à l'encontre des données épidémiologiques mettant en évidence que 1) dans des zones où le parasite est détecté chez des huîtres il n'est pas détecté chez les moules et vis-versa, et 2) *Marteilia* est responsable d'importantes mortalités au sein des élevages d'huîtres alors que l'association entre la présence de *Marteilia* et des mortalités de moules reste très controversées (Balouet *et al.*, 1979; Alderman, 1979; Grizel, 1985; Robledo et Figueras, 1995; Villalba *et al.*, 1993; Berthe *et al.*, 1998).

Face à ces deux types de données antagonistes, nous avons recherché un polymorphisme au sein de l'intervalle transcrit 1 (ITS 1) des gènes ribosomiaux de *Marteilia*. En effet, le gène 18S peut s'avérer trop conservé pour différencier des parasites proches mais pouvant présenter des spécificités d'hôtes et différentes pathogénies (Hide et Tait, 1991). La mise en évidence de différentes sous espèces ou souches, peut-être réalisée par l'étude de séquences moins

conservées. La région ITS-1 des gènes ribosomiaux évolue plus rapidement que le gène 18S et répond donc à ces critères.

Un dimorphisme a été mis en évidence au sein de cette région chez *Marteilia* (Le Roux *et al.*, 2001, fourni en annexe 1). Nous avons pu définir au sein de l'espèce *M. refringens*, un type O, toujours détecté chez les huîtres, et un type M, toujours détecté chez les moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Les types O et M pourraient correspondre aux espèces *refringens* et *maurini* respectivement, décrits il y a 30 ans sur la base de données ultrastructurales. Le type O pourrait être pathogène contrairement à M.

Dans le cadre de la gestion du risque de transmission de la marteiliose, le contrôle des moules ne serait pas nécessaire puisqu'elles sont infectées par un autre type de parasite et ne seraient pas considérées comme un vecteur de la marteiliose.

Cependant, de rares cas de coinfection par les 2 types de parasites ont été détectés chez la moule par PCR. Actuellement nous ne disposons pas d'outil permettant d'évaluer si le parasite de type O se développe chez la moule. Il apparaît donc aujourd'hui primordial de définir si la moule coinfectée par M et O, peut produire du type O fonctionnel ayant la capacité d'infecter et donc de causer la mort de *O. edulis*. Il est nécessaire de développer des outils d'hybridation in situ spécifiques de chacun des 2 types.

5. Cycle de vie

5.1. Cycle de développement au sein de *Ostrea edulis*

Les premières observations du parasite réalisées en histologie par Herrbach (1971) et Comps (1970) ont mis en évidence différents types cellulaires sphériques évoluant vers des cellules polynucléées.

Les premiers stades de développement (cellules primaires à secondaires) sont décrits essentiellement dans l'épithélium cilié de l'estomac, toutefois ces jeunes stades peuvent être observés dans le reste de la glande digestive et plus rarement dans les branchies (Comps, 1970). La prolifération de ces stades dans les diverticules digestifs précède le développement des stades suivants qui conduiront à la formation des sporanges contenant des granules réfringents et des spores (Grizel *et al.*, 1974; Perkins, 1976).

Le stade initial est constitué par une cellule souche ou cellule primaire (Grizel *et al.*, 1974) dont le cytoplasme renferme des inclusions paracrystallines, des formations vacuolaires et des haplosporosomes (Perkins, 1976). Cette cellule est en contact étroit avec les membranes cellulaires de l'hôte par l'intermédiaire de microvillosités (Grizel *et al.*, 1974).

Les cellules secondaires résultent d'une différenciation du cytoplasme autour des noyaux issus de la division endogène du noyau de la cellule primaire. Ces cellules se caractérisent par un noyau comportant un nucléole volumineux, et par des inclusions cytoplasmiques denses aux électrons. La cellule primaire contenant jusqu'à huit cellules secondaires est assimilée à un pseudoplasmode et peut atteindre 30 μm de diamètre (Figure 10). La cellule secondaire (de 10 à 15 μm de diamètre) devient le pansporoblaste (ou le sporange, terme choisi dans cette étude pour désigner le type cellulaire contenant les spores) après formation de quatre cellules tertiaires par bourgeonnement endogène (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977).

Les cellules tertiaires donnent des spores contenant trois sporoplasmes issus de divisions endogènes. Le sporoplasme le plus externe assimilé à une cellule primaire, comporte également des haplosporosomes (Perkins, 1976). Les spores atteignent 4 μm de diamètre.

A maturité, la paroi des cellules primaires se rompt libérant les sporanges (Herrbach, 1971, Grizel, 1985) que l'on peut observer dans les fèces et dont la taille est comprise entre 9 et 19 μm (Perkins, 1976) (Figure 10 et 11).

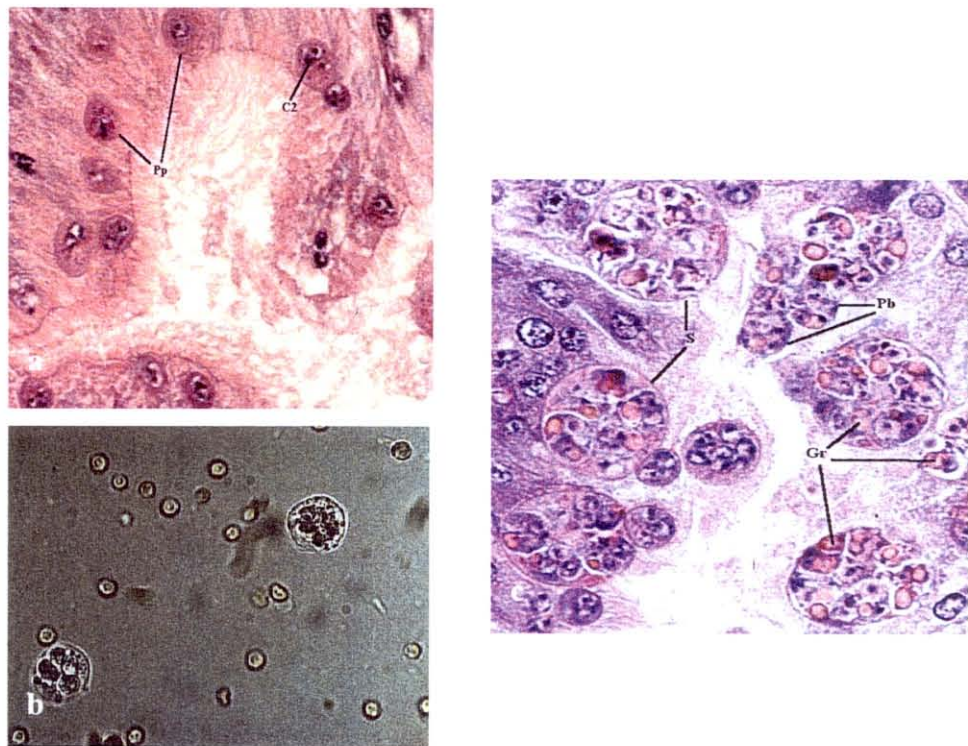


Figure 10: Stades de développement de *Marteilia refringens* au sein de la glande digestive de *Ostrea edulis*. (a : cellules primaires à secondaires, b : pansporoblastes, c : sporanges libérés dans les fèces de l'huître).

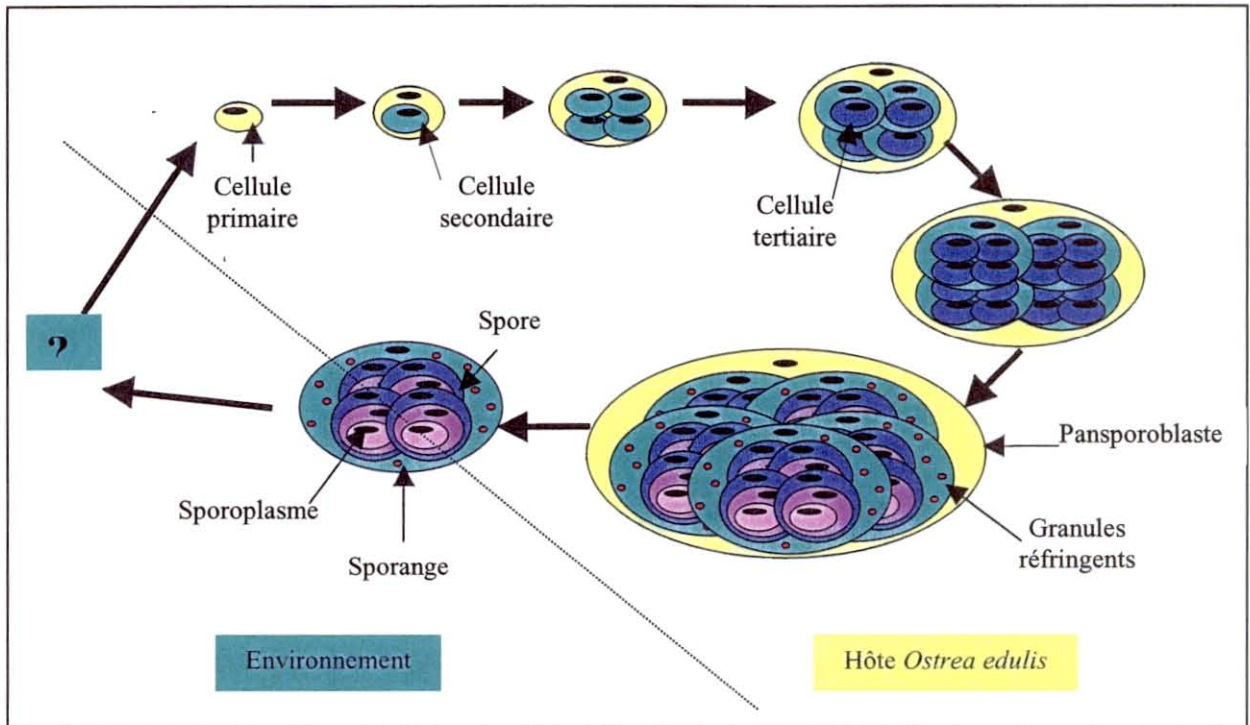


Figure 11 : Schéma du cycle de développement de *Marteilia refringens* au sein de *Ostrea edulis*.

Pour Grizel *et al.* (1974) et Franc (1980), le cycle de développement de *Marteilia refringens* serait plus complexe et ferait notamment intervenir une phase de multiplication interne du parasite par «schizogonie», suivie d'une deuxième phase, «sprorogonique» pour Grizel *et al.* (1974), ou sexuée pour Franc (1980). La schizogonie impliquerait une multiplication des cellules secondaires puis une libération dans l'hôte favorisant l'invasion de celui-ci.

Dans ce manuscrit, la troisième partie reviendra sur ces hypothèses d'après les observations de Barnaud (2001) réalisées lors de l'étude de la dynamique de *M. refringens* au sein d'huîtres plates placées en claire.

5.2. Influence des paramètres environnementaux

5.2.1. Cycle saisonnier

La marteiliose est une maladie saisonnière pour laquelle une nette augmentation des taux d'infestations est observée pendant l'été. Ainsi, d'après les observations de Grizel (1985), dans le cas d'huîtres plates de Bretagne, le taux de parasitisme est au plus bas en mars et avril, c'est à dire après les deux mois généralement les plus froids de l'année (Figure 12). Il augmente à partir de mai lorsque les températures atteignent les 12 °C, et atteint sa valeur

maximale de juin à août pour diminuer jusqu'au mois de décembre. L'augmentation du taux de parasitisme observée au printemps semble être liée à une multiplication interne du parasite. Les mécanismes cellulaires mis en jeu par le parasite pour assurer cette multiplication restent hypothétiques (Grizel *et al.*, 1974 ; Franc, 1980 ; Barnaud, 2001). L'action de la température semble primordiale pour déclencher la reprise du développement de *Marteilia* chez l'huître. Les formes primaires à secondaires sont présentes toute l'année alors que les formes sporales disparaissent au cours de l'hiver (Figure 12). Les formes les plus jeunes correspondraient à une infestation chronique durant toute l'année alors que les stades cellulaires plus complexes dépendraient d'un cycle saisonnier et seraient responsables de la dispersion du parasite dans le milieu (Balouet, 1979 ; Grizel, 1985).

La contamination d'huîtres saines ne s'effectue qu'au cours de la période estivale lorsque le seuil thermique de 17 °C est atteint (Grizel, 1985). Balouet *et al.* (1979b) ont aussi montré que l'infestation se produit durant les mois de juillet et août (en rade de Brest) quelle que soit la durée d'immersion en zone contaminée. Après cette période, des huîtres saines placées en zone contaminée restent indemnes.

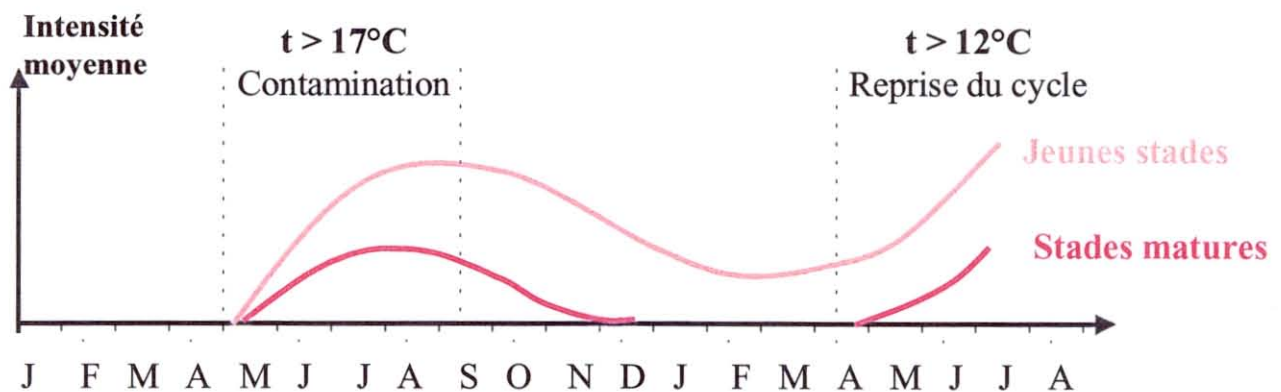


Figure 12 : Représentation schématique de l'évolution de l'intensité d'infection par *Marteilia refringens* dans *Ostrea edulis* en différenciant les formes jeunes (présence de cellules primaires à secondaires) et les formes matures (présence de cellules tertiaires).

Des variations saisonnières et géographiques peuvent modifier la durée et la période de cette fenêtre d'infestation, mais la température semble un facteur primordial dans la transmission de la parasitose.

5.2.2. Répartition géographique

Dans les zones endémiques, le parasite est réparti selon un gradient océano-estuarien et n'est présent que les baies et fonds d'estuaires (Balouet *et al.*, 1979b ; Grizel, 1985). Cette répartition pourrait être contrôlée par la température, la salinité, et le renouvellement des eaux. La dégradation du milieu par l'utilisation des parcs ostréicoles (accumulation de déchets, perturbations au niveau du substrat) serait également favorable à l'épizootie. Par ailleurs, un fort renouvellement des eaux pourrait impliquer une "dilution" du parasite dans le milieu, limitant la transmission de la parasitose (Grizel, 1985).

Les autres parasites appartenant au genre *Marteilia* ont été observés dans le même type d'environnement que *M. refringens*. *Marteilia maurini* a été initialement décrit chez des moules *Mytilus galloprovincialis* provenant de la lagune de Venise (Comps *et al.*, 1982), puis observé chez des moules *Mytilus edulis* sur les côtes françaises (Auffret et Poder, 1983). Figueras *et al.* (1991) ont mis en évidence la présence de *Marteilia maurini* chez des moules *M. galloprovincialis* au sein des zones internes de la rivière de Arosa en Gallice. Une répartition similaire a été observée dans la rivière de Vigo (Gallice) par Robledo *et al.* (1994). Le parasite *Marteilia christenseni* a été décrit chez des scrobiculaires *Scrobicularia piperata* échantillonnées à Ronce les Bains dans la partie sud du bassin de Marennes-Oléron (Comps, 1983). Les scrobiculaires sont observées dans des environnements plutôt vaseux, à nouveau de type estuarien.

De la même façon, les *Marteilia* sp. ont été observés chez des bivalves présents dans les zones déjà contaminées par *M. refringens*, en France ou en Galice (Comps *et al.*, 1975 ; Auffret et Poder, 1983 ; Auffret et Poder, 1987 ; Villalba *et al.*, 1993).

Marteilia sydneyi, est observé sur la côte est de l'Australie, au sud du Queensland. Les plus importantes mortalités causées par ce parasite sont observées au cours de l'été austral (de décembre à mars). Dans la partie nord de son aire de répartition, la maladie QX est liée à de faibles salinités et de fortes températures. L'étude de Adlard et Ernst (1995) a confirmé ces observations en étudiant différents lots d'huîtres placés dans l'estuaire George situé dans la partie sud de l'aire de répartition de *M. sydneyi*. Ces travaux ont mis en évidence que les plus fortes prévalences du parasite sont observées dans la partie amont de l'estuaire, soumise à de faibles salinités.

5.3. L'hypothèse du cycle hétéroxène

Les essais de transmission de la marteiliose en milieu naturel ont mis en évidence le cycle saisonnier de *Marteilia refringens* et la période d'infestation (Balouet, 1979 ; Balouet *et al.*, 1979b ; Grizel et Tigé, 1979 ; Grizel, 1985). Cependant, l'influence des paramètres environnementaux n'ont pas permis d'expliquer l'absence de transmission de la parasitose en certains sites. Ainsi, en 1979 des huîtres plates de Bretagne infectées par *Marteilia refringens*, puis exportées en Hollande n'ont subi aucune mortalité. De plus, aucune contamination des huîtres plates saines présentes en ce site n'a été observée et ce malgré des températures, salinités et facteurs culturaux similaires à ceux de Bretagne (Van Banning, 1979). Par ailleurs, il faut noter que la zone de Hollande où ces huîtres ont été exportées est caractérisée par de forts courants de marée. Le facteur renouvellement d'eau diffère donc de ce qui avait pu être noté dans les zones endémiques françaises (Balouet *et al.*, 1979b ; Grizel, 1985).

5.3.1. Les essais de transmission horizontale

Des essais de transmission du parasite en milieu expérimental ont été réalisés. Diverses méthodes ont été utilisées : cohabitation d'huîtres plates, de moules, injections de suspensions de spores et de broyats d'huîtres parasitées (Balouet *et al.*, 1979b ; Grizel, 1985 ; Berthe *et al.*, 1998). Quel que soit le protocole expérimental mis en place, il n'a jamais permis d'infecter des animaux sains.

Cette absence de transmission peut être expliquée par 1) une phase de maturation nécessaire des stades du parasite utilisés dans ces essais ou 2) l'implication d'une autre espèce hôte.

Les injections de suspensions de spores ou de broyats d'huîtres ne contiennent pas forcément la forme infestante pour l'hôte aval. La phase de libération du parasite dans l'environnement via les fèces d'huîtres pourrait constituer une phase de maturation importante dans le développement de cette forme (Roubal *et al.*, 1989). L'utilisation de stades de développement se trouvant au sein de l'huître est donc problématique.

De la même façon, *Marteilia sydneyi*, n'a jamais pu être expérimentalement transmis en exposant des sporanges matures ou en transplantant de la glande digestive de *Saccostrea commercialis* infectée à des huîtres saines (Lester, 1986). A nouveau, la transplantation de glande digestive pourrait ne pas contenir le stade infestant pour l'hôte aval. Par contre, l'utilisation de sporanges matures libérés via les fèces dans l'environnement semble plus judicieuse.

L'un des biais expérimentaux peut résider dans le temps de cohabitation ou d'exposition entre les sporanges et les animaux sains. Pour Grizel (1985) le parasite pourrait nécessiter une période de maturation dans le sédiment avant d'acquérir sa forme infestante, ce qui pourrait expliquer l'absence de transmission d'un bivalve à un autre. Cependant, aucune donnée n'a pu démontrer la capacité des sporanges à survivre pendant une période prolongée au sein du sédiment (Roubal *et al.*, 1989).

D'après ces essais de transmission du parasite et les observations de terrain mettant en évidence des zones où la transmission du parasite ne semble pas avoir lieu, l'hypothèse d'un cycle complexe et notamment d'un cycle hétéroxène (faisant intervenir d'autres espèces hôtes) a été posée.

5.3.2. Tester l'implication d'hôtes potentiels

Dès le début, les études se sont orientées vers la recherche d'hôtes potentiels de *Marteilia refringens*. Dans ce cadre, des parasites du genre *Marteilia* ont été décrits en histologie ou microscopie électronique chez d'autres bivalves (*Marteilia maurini* décrit chez les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*, *M. christenseni* chez *Scrobicularia piperata*, *M. lengehi* chez *Crassostrea cucullata* et *M. sp.* chez les palourdes, et les coques). Cependant, ces observations ont mis en évidence des stades de développement du parasite similaires à ceux déjà observés chez *Ostrea edulis*.

Les recherches du parasite chez d'autres invertébrés ont été menées par Balouet *et al.* (1979b). L'utilisation de l'histologie pour identifier *Marteilia refringens* chez des hôtes potentiels tels que des Annélides (*Spirorbis sp.*, *Polydora sp.*, *Pomatoceros triqueter*), le mollusque gastéropode *Crepidula fornicata*, des crustacés (*Galathea squamifera*, *Portunus puber*, *Carcinus maenas*) ainsi que des études ultrastructurales sur des échantillons de zooplancton n'ont pas mis en évidence d'éventuels hôtes de *M. refringens*.

Au cours des années 70, l'importation en Hollande d'huîtres plates parasitées par *Marteilia refringens* en provenance de Bretagne a mis en évidence une situation particulière. Au sein des zones d'élevage de Hollande, les huîtres saines n'ont pas présenté d'infection par *Marteilia* et ce malgré leur proximité avec les huîtres parasitées (Van Banning, 1979). L'absence d'un hôte dans ces sites d'élevage pouvait expliquer ces résultats. Il envisagea de tester l'implication dans le cycle de *M. refringens* de l'amphipode *Marinogammarus marinus*, espèce très abondante en Bretagne et dont la faible abondance dans la zone étudiée en

Hollande pouvait "bloquer" le cycle du parasite. Les essais de transmission à l'amphipode par exposition à des glandes digestives parasitées par *M. refringens* n'ont pas permis de d'infecter l'amphipode. Le même type d'essai de transmission a été réalisé avec le crabe *Carcinus maenas* et la crevette *Crangon crangon*. A nouveau, aucune infestation n'a pu être mise en évidence. Cependant, il faut noter que l'utilisation d'outils de détection basés sur la reconnaissance d'une morphologie n'est pas adaptée à ce type d'étude. En effet, les stades de développement au sein d'autres hôtes ne sont pas connus.

Ainsi, malgré les nombreuses études menées pour mettre en évidence le cycle de vie de *Marteilia refringens*, seules les données relatives au cycle de développement chez *Ostrea edulis* et l'influence des paramètres environnementaux ont permis de gérer le risque de contamination. Les infestations par *Marteilia* ont été limitées par la culture des huîtres en eaux profondes et en région Nord Bretagne où le parasite n'est pas présent. Ainsi, le naissain âgé de 1 an est semé au printemps en eaux profondes et est élevé jusqu'à la fin de l'année suivante. Jusqu'à cet âge, le taux d'infection par *Bonamia ostreae* serait limité. Les huîtres sont généralement vendues à cet âge (2 ans et demi) malgré un poids inférieur (40g) au poids commercial traditionnel (entre 50 et 75g). Cependant, la connaissance du cycle de vie de *Marteilia refringens* est primordiale pour gérer de façon optimale les risques de contamination au sein des zones endémiques.

III. Problématique de l'étude

Le parasite *Marteilia refringens* est présent à l'état endémique sur les côtes françaises. De part l'absence de connaissance du mode de transmission de ce parasite, la gestion de la marteiliose est basée sur les observations empiriques de la répartition spatio-temporelle de cette maladie. Une meilleure description du cycle de *Marteilia*, et surtout des interactions existant entre ce parasite et ses hôtes apportera une amélioration à la gestion actuelle. L'objectif de cette thèse est de donner une vision fonctionnelle du cycle après avoir identifié ses différents hôtes.

Une telle étude nécessite la mise au point d'outils spécifiques de *M. refringens*. Ces outils doivent permettre la détection du parasite spécifiquement, et ce quel que soit son stade de développement et son hôte. Dans ce cadre, les techniques se basant sur l'observation de

caractéristiques microscopiques ne peuvent être utilisées dans la mesure où la morphologie du parasite chez d'autres hôtes nous est inconnue. Les outils de biologie moléculaire ont pour cible une molécule conservée quel que soit le stade de développement, et présentant des zones spécifiques de taxon, l'ADN. De ce fait, ces outils sont parfaitement adaptés à notre étude.

Toutefois, la recherche de *M. refringens* dans une zone endémique telle que la baie de Marennes-Oléron n'est pas envisageable. Un tel écosystème comporte plus de 1000 espèces soit un nombre trop important à analyser (Bodin, 1974 ; Sautour, 1991 ; de Montaudouin et Sauriau, 2000) . Il apparaît nécessaire de disposer d'un écosystème à biodiversité réduite. Les travaux antérieurs ont montré la fonctionnalité du cycle de *M. refringens* dans les claires ostréicoles du Bassin de Marennes-Oléron (Berthe *et al.*, 1998). Ces bassins, soumis à d'importantes variations des paramètres environnementaux, sont caractérisés par une faible biodiversité par rapport à des zones moins confinées. Nous avons donc choisi d'utiliser ces claires comme modèle d'étude de la marteiliose.

Dans ce manuscrit, nous présenterons tout d'abord la mise au point des différents outils utilisés. Ce travail est présenté dans un article publié dans *Marine Biotechnology* (Le Roux *et al.*, 1999).

L'étude de la dynamique de *M. refringens* chez *Ostrea edulis* et la mise en évidence des espèces de la claire, constituent la 3^{ème} partie de manuscrit. Ces données sont présentées dans un article publié dans le *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* fourni dans cette 3^{ème} partie (Audemard *et al.*, 2001).

Les résultats de l'application des outils de biologie moléculaire sur notre modèle d'étude sont présentés dans la 4^{ème} partie de ce manuscrit. Ils font l'objet d'un article sous presse dans *Parasitology* (Audemard *et al.*, sous presse)

La dynamique de l'infection de *Marteilia refringens* chez ses hôtes est étudiée au sien de notre modèle d'étude. Ces données sont présentées en 5^{ème} partie et sont actuellement soumises pour publication dans le *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

Enfin, dans la sixième et la dernière partie de ce manuscrit, nous discuterons une vision fonctionnelle du cycle de *M. refringens* en intégrant les différentes connaissances acquises au cours de notre étude.

Deuxième partie :

Les outils de détection de *Marteilia refringens*

Les outils de détection utilisés pour rechercher les hôtes d'un parasite doivent répondre aux 3 critères « La vérité, rien que la vérité, toute la vérité ». Ces outils doivent être spécifiques du parasite et doivent permettre la détection du parasite sous toutes ses formes, autrement dit, quel que soit son stade développement.

Les outils reposant sur la détection de caractères phénotypiques (immunologie, microscopie) ne répondent pas à ces critères. Ils peuvent être trop peu discriminants dans le cas de taxon proches et peuvent de plus, n'être spécifiques que d'une partie des stades de développement du parasite. Les outils de biologie moléculaire présentent un avantage fondamental par rapport aux précédentes techniques car ils ont pour cible l'ADN. Cette molécule et plus particulièrement les gènes d'intérêt phylogénétique, présente des zones spécifiques d'un taxon. De plus, les caractéristiques de cette molécule se conservent quels que soient les stades de développement du parasite. Ce sont donc ces outils qui ont été utilisés au cours de notre étude.

Le gène ciblé est le gène 18S codant pour la petite sous-unité ribosomale de *Marteilia refringens*. Ce gène d'intérêt phylogénique a récemment été séquencé et comparé aux gènes 18S d'une cinquantaine d'espèces de protozoaires (Berthe *et al.*, 2000). Il a ainsi été mis en évidence d'une part des régions conservées entre ces différentes espèces et le parasite *M. refringens* et, d'autre part, des régions spécifiques de *M. refringens*. En fonction de la région ciblée par les outils, la détection peut concerner l'ensemble des espèces, ou, au contraire *M. refringens* exclusivement.

Le gène 18S est présent au sein du génome sous forme d'un très grand nombre de copies ce qui permet une meilleure sensibilité de détection

Plusieurs techniques de biologie sont utilisées pour leur complémentarité. La détection de l'ADN de *M. refringens* est réalisée grâce à la technique de polymérisation en chaîne ou PCR, méthode très sensible et rapide qui permet l'amplification spécifique d'un fragment du génome recherché. La technique de Southern blot permet ensuite de confirmer la spécificité

du fragment amplifié. Afin de localiser l'ADN détecté et de déterminer si cette détection est liée à un réel parasitisme ou à la présence fortuite du parasite (par exemple une ingestion). La technique d'hybridation *in situ* permet de fournir l'information topographique recherchée par le biais de l'hybridation potentielle d'une sonde ADN marquée, spécifique de *M. refringens*, sur des coupes de tissus.

Les amorces de PCR sont choisies soit dans les régions conservées du gène 18S (amorces universelles CS1, CS2 et CAS1), soit dans les zones spécifiques de *M. refringens* (amorces spécifiques : SS2, SAS2, SAS1). Les premières amorces doivent théoriquement permettre une amplification quelle que soit l'espèce considérée. Il sert de contrôle interne à la réaction de PCR (Figure 13). Ce contrôle est essentiel car la PCR dépend de la qualité et de la quantité d'ADN présent. Une dégradation de l'ADN ou une trop faible quantité peuvent être des facteurs limitant conduisant à de faux résultats négatifs. De plus, certains composés (ions, protéines, ...) sont susceptibles d'inhiber la réaction de PCR.

Dans le cas où l'amplification d'ADN est obtenue avec des amorces conservées, la recherche d'ADN de *Marteilia refringens* est effectuée grâce à une seconde réaction de PCR réalisée avec des amorces spécifiques du parasite (Figure 13). La spécificité du fragment amplifié par PCR doit être confirmée par Southern Blot, technique faisant intervenir une sonde ADN (MARS) complémentaire d'une zone interne du fragment amplifié grâce aux amorces spécifiques.

Enfin, dans le cas où nous détectons l'ADN de *M. refringens*, la localisation de l'ADN du parasite sur des coupes de tissus est réalisée grâce à la technique d'hybridation *in situ*. Grâce à cette technique, un fragment d'ADN du parasite peut être localisé dans une cellule ou des tissus grâce à la sonde Smart2 marquée spécifique de *Marteilia refringens* (Figure 14) Dans cette technique, les contrôles de l'accessibilité des tissus pour la sonde ADN et de la spécificité de l'hybridation sont essentiels pour éviter les faux résultats négatifs et positifs. Ces contrôles font intervenir respectivement, une sonde complémentaire des zones conservées du gène 18S, et une sonde spécifique d'un autre organisme.

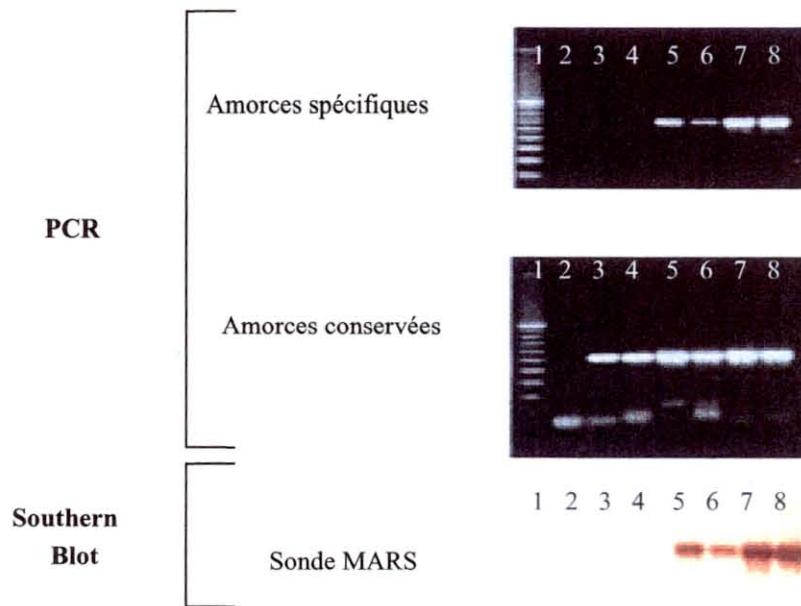


Figure 13 : Amplification par PCR de fragments du gène 18S et contrôle de la spécificité par Southern Blot grâce à la sonde oligonucléotidique (MARS). Les produits PCR sont détectés sur un gel d'agarose additionné de bromure d'éthidium. Les ADN analysés proviennent de moule saine (3), d'huître saine (4), de moules parasitées par *Marteilia* (5), d'huîtres parasitées par *Marteilia* (6) et de parasite *Marteilia* purifié à partir de moules (7) et d'huîtres (8). (Marqueur de taille (1), et contrôle négatif (2)).



Figure 14 : Détection de *Marteilia refringens* sur des coupes de tissus d'huîtres plates par les techniques histologiques classiques (a) ou par hybridation *in situ* avec la sonde Smart2. (a) : coloration Hemalum éosine, X50 et (b) : contre coloration au vert de Malachite (X25).

La mise au point de ces outils a fait l'objet d'un article publié dans Marine Biotechnology (Le Roux *et al.*, 1999).

Article Mar. Biotechnol. 1, 588-597, 199

DNA Probes As Potential tools for the detection of Marteilia refringens

Frédérique Le Roux, Corinne Audemard, Antoine Barnaud, and Franck Berthe

Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER BP133, 17 390 La Tremblade, France
Laboratoire de Biométrie et biologie évolutive, UMR CNRS 5558, Université Claude
Bernard, 43 Bd du 11 Novembre 1978, 69622 Villeurbanne cedex, France

Abstract: Since its first description, the paramyxean parasite *Marteilia refringens* has been recognized as a significant pathogen of bivalve mollusks. The existence of a complex life cycle was postulated by many authors. Here we report the development of DNA-based detection assays as powerful tools to elucidate the *Marteilia refringens* life cycle. After alignment of the *Marteilia refringens* ribosomal DNA small subunit sequence with those of various eukaryotic organisms, polymerase chain reaction primers were designed. Specific primers were used to amplify DNA extracted from purified *Marteilia refringens* and infected hosts. The specificity of amplified fragments was confirmed by Southern blotting with an oligoprobe. For in situ hybridization, four probes were tested for specific detection of 18S rRNA isolated from *Marteilia refringens* and other eukaryotic cells by Northern blotting. The most specific probe, Smart 2, was successfully used to detect *Marteilia refringens* by in situ hybridization in infected oysters and mussels.

Key words: Paramyxea, detection, PCR, in situ hybridization, rDNA small subunit, parasite life cycle

Troisième partie :

Le modèle d'étude de la marteiliose

Dans le cadre de la recherche d'hôtes de *Marteilia refringens*, la biodiversité constitue une limite majeure. Une telle étude ne peut être envisagée dans un écosystème tel que le bassin de Marennes-Oléron où plus de 1000 espèces ont été répertoriées (Bodin, 1974 ; Sautour, 1991 ; de Montaudouin et Sauriau, 2000).

Les précédentes études visant à mettre en évidence des hôtes de *M. refringens*, ont volontairement restreint le nombre de candidats. Les critères de sélection des espèces étaient basés sur les observations de terrain mettant en évidence une répartition spatio-temporelle pouvant se superposer aux données relatives au parasite (Balouet *et al.*, 1979b ; Van Banning, 1979). Ce type d'investigation restait très lourd à mener et pouvait ne pas prendre en compte les hôtes véritables du parasite concerné. De plus, ce type de recherche restait dépendante de l'aspect ouvert du milieu marin et donc des migrations d'espèces, et des déplacement des masses d'eau.

Au cours d'essais de transmission de *M. refringens*, Berthe *et al.* (1998) ont mis en évidence que l'infection des huîtres plates avait lieu dans un écosystème particulier du Bassin de Marennes-oléron, les claires ostréicoles. Ces bassins, traditionnellement utilisés en ostréiculture sont semi-ouverts, c'est-à-dire que le renouvellement partiel de l'eau de la claire est possible lorsque les coefficients de marée sont supérieurs à 80. Pour les coefficients inférieurs, la claire fonctionne en système fermé (Figure 15).

De faible surface et de faible profondeur, ces bassins sont soumis à d'importantes variations des paramètres environnementaux et sont reconnus pour ne comporter qu'un faible nombre d'espèces (Reymond, 1991). Ces claires apparaissent comme l'environnement le plus adapté à l'étude de la marteiliose et constituent notre modèle d'étude.

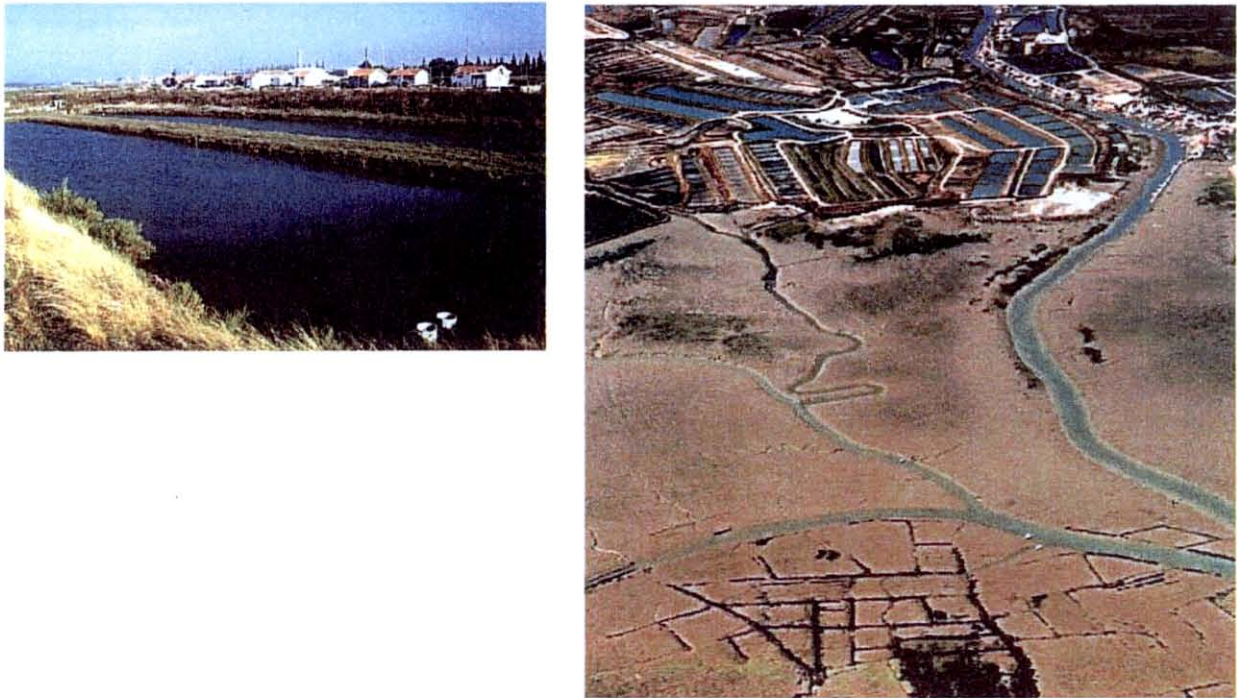


Figure 15: Photos des claires du CREA A (S-E Oléron) et des chenaux à marée basse.

La dynamique de *M. refringens* chez *Ostrea edulis* est étudiée dans notre modèle d'étude. Deux lots d'huîtres plates sont placés en claire : un lot d'huîtres parasitées par *Marteilia refringens* et un lot non infecté. La recherche de *M. refringens* chez ces huîtres est réalisée à l'aide des méthodes histologiques conventionnelles et permet de définir l'évolution des prévalences et des intensités parasitaires.

Dans la claire, le parasite reprend son développement chez les huîtres parasitées dès le mois de Mars avec l'élévation printanière des températures de l'eau. L'augmentation de l'intensité parasitaire observée est attribuée à une multiplication interne du parasite grâce à la réinfestation de certaines cellules filles issues de la sporogonie du parasite.

Il s'écoule environ 2 mois entre les premiers sporanges libérés dans l'environnement et l'infection des huîtres initialement saines. Cette infection est observée dès mi-juin, lorsque le seuil des 17°C est atteint de façon continue. Cette fenêtre temporelle semble suffisante pour permettre l'intervention d'un ou plusieurs hôtes intermédiaires.

L'échantillonnage de la faune (macrofaune, méiofaune et zooplancton) est réalisé dans le but de rechercher le parasite au sein de l'ensemble de ces espèces. La fréquence d'échantillonnage a été adaptée au cycle de vie des différents groupes d'espèces. Elle est mensuelle pour les

espèces de la macrofaune, et hebdomadaire pour le zooplancton et la méiofaune. Le nombre d'espèces identifiées est au moins 10 fois plus faible qu'au sein de la baie de Marennes-Oléron.

L'intérêt des claires ostréicoles en tant que modèle d'étude de la marteillose est confirmée par les résultats de ce travail. Dans ces bassins, le cycle de *M. refringens* est fonctionnel et le nombre d'espèces est réduit. En outre, nous avons exploré la dynamique du parasite chez les huîtres. Les caractéristiques de ce modèle d'étude sont présentées à la suite de cette introduction dans un article publié dans le Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (Audemard *et al.*, 2001).

Article «Journal of Experimental Marine Biology & Ecology 257 (2001) : 87-108

Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives

C. Audemard, A. Barnaud, C. M. Collins, F. Le Roux, P. G. Sauriau, C. Coustau, P. Blachier, F. C. J. Berthe

Laboratoire Génétique et Pathologie, IFREMER, 17390 La Tremblade
Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture, CREMA (CNRS-
IFREMER), 17137 L'Houmeau
Laboratoire de Biologie Animale, CNRS UMR 55555, CBETM, Université de
Perpignan, 66100 Perpignan
Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole, CREEA, Prise de
Terdoux 17480 Le Château d'Oléron

Accepted 10 November 2000

Abstract

Since its first description, the paramyxean parasite *Marteilia refringens* (Grizel et al.) has been recognised as a significant pathogen of the European fiat oyster *Ostrea edulis* L. The existence of a complex life-cycle involving several hosts was postulated early on by many authors, although it remains unsolved. Recent developments in the DNA-based diagnosis of *M. refringens* provides new prospects for the detection of the parasite in potential hosts. However, this screening remains impeded by the number of species living in the vicinity of oyster beds. We report here on the use of semi-closed oyster ponds (so called 'claire' in Marennes-Oléron Bay) as a study model for the life-cycle of *M. refringens*. Claires are located in an endemic area for *M. refringens* and transmission of the disease to healthy oysters has been shown to be effective during the course of this study. The environmental characteristics of the claires strongly limit the number of species compared with intertidal areas and oyster beds. Consequently, extensive sampling of a limited number of species cohabiting with oysters was possible. These were preserved for future screening of *M. refringens*. The experimental model should bring new insights to the life-cycle of *M. refringens*, as it enables us to propose new conceptual schemes of *M. refringens* transmission. The role of species as potential hosts is discussed regarding their biology and geographical distribution. © 2001 Elsevier Science BV AU rights reserved.

Keywords : *Ostrea edulis*; *Marteilia refringens*; Life-cycle; Experimental model; Oyster pond

Quatrième partie :

Mise en évidence de l'implication de *Paracartia grani* dans le cycle de *Marteilia refringens*

L'utilisation des outils de détection de *Marteilia refringens* dans notre modèle d'étude caractérisé par sa faible biodiversité permet la recherche du parasite sur l'ensemble des espèces échantillonnées en 1998 et 1999.

Notre stratégie d'étude fait intervenir deux étapes successives permettant 1) de sélectionner des hôtes potentiels et 2) de tester leur implication dans le cycle de vie de *Marteilia refringens*.

La première étape de notre étude est la recherche par PCR d'ADN de *Marteilia refringens* chez les espèces échantillonnées en claire. Sur la base de ces résultats, 4 groupes d'espèces ont pu être déterminés : des espèces chez lesquelles l'ADN du parasite n'a jamais, occasionnellement ou fréquemment été détecté, mais aussi des espèces dont l'ADN ne peut être amplifié par cette technique.

Dans un premier temps, la distinction de ces différents groupes permet de sélectionner des espèces présentant des détections fréquentes comme les candidats les plus probables. Le statut vis-à-vis de l'infection du parasite, n'a pu être défini pour les espèces ne présentant pas de détection d'ADN du parasite ce qui constitue l'une des limites de cette étude. La détection ponctuelle d'ADN pour 11 espèces est attribuée à une présence fortuite de cet ADN, résultant d'une ingestion ou d'un portage du parasite.

Les deux seules espèces présentant des détections récurrentes sont un copépode *Paracartia grani* et un cnidaire *Cereus pedunculatus*. Afin de distinguer une détection d'ADN liée à du parasitisme d'une détection liée à une présence fortuite, nous avons réalisé une hybridation in situ sur ces deux espèces. Chez *C. pedunculatus* le parasite n'est pas observé au sein des tissus et la détection de *M. refringens* chez ce cnidaire peut être attribuée à une ingestion. En revanche, chez *P. grani*, *M. refringens* a pu être localisé dans le système ovarien, parfois de l'ovaire aux oviductes. Les cellules marquées sont de petite taille (quelque micromètres de diamètre) et peuvent être présentes en très grand nombre ce qui peut être lié à une phase de multiplication du parasite dans ce copépode. L'implication de *Paracartia grani* dans le cycle

de vie de *Marteilia refringens* a été confirmé par des essais de transmission expérimentale au cours desquels le parasite a pu être transmis de l'huître vers le copépode.

L'écologie de *P. grani* correspond aux données épidémiologiques de la maladie ce qui donne plus de poids aux résultats expérimentaux. *Paracartia grani* est observé dans les baies et les estuaires et dans l'aire de répartition géographique de *M. refringens*. Ce copépode présente un cycle saisonnier très marqué avec des abondances maximales en été c'est à dire pendant la période d'infection des huîtres.

Au cours de cette étude plusieurs limites ont pu être rencontrées. Il nous est impossible de conclure sur le statut potentiel des espèces dont l'ADN n'a pu être amplifié par PCR. Cette limite est liée aux difficultés d'amplification de l'ADN lorsque la qualité et la quantité ne sont pas optimales.

Au cours de cette recherche d'ADN, le nombre d'individus échantillonnés et la dilution potentielle de l'ADN du parasite par analyse de pools d'individus, constituent aussi des limites à la définition du statut des espèces concernées.

L'hybridation *in situ* et les analyses complémentaires par histologie du parasite observé chez le copépode ne nous permettent pas de décrire avec précision les stades présents et leur cycle de développement dans cet hôte. Des études de l'ultrastructure du parasite chez le copépode seront nécessaires.

Enfin, face aux échecs de transmission du parasite du copépode vers l'huître, l'implication d'autres espèces hôtes ne peut être rejetée. Dans notre modèle d'étude, l'un des premiers candidats est *C. pedunculatus* cependant l'hybridation *in situ* n'a jamais permis de détecter le parasite au sein des tissus de cette espèce. Les espèces présentant des détections occasionnelles pourraient être prises en compte et un effort de serait à fournir pour analyser les espèces dont le statut n'a pu être défini en l'absence d'amplification de l'ADN par PCR.

L'ensemble de ces résultats est présenté à la suite de cette introduction et fait l'objet d'un article sous presse dans le journal *Parasitology* (Audemard *et al.*, sous presse).

Article sous presse dans Parasitology

Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*

C. AUDEMARD¹, F. LE ROUX¹, A. BARNAUD¹, C. COLLINS¹, B. SAUTOUR², P-G. SAURIAU³, X. de MONTAUDOUIN², C. COUSTAU⁴, C. COMBES⁴ and F. BERTHE¹.

¹Laboratoire Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 133, 17390 La Tremblade, France

²Laboratoire d'Océanographie Biologique, UMR 5805- Université Bordeaux I - CNRS, 2, rue du Professeur Jolyet, 33120 Arcachon, France

³Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture, L'Houmeau, B.P.5, 17137 L'Houmeau, France

⁴Laboratoire de Biologie Animale, CNRS UMR 5555, CBETM, Université de Perpignan, 66860 Perpignan, France

Running title : *Paracartia grani* a host of *Marteilia refringens*

Corresponding author: F. Berthe. Laboratoire Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 133, F-17390 La Tremblade. Tel: +33-5-4636-9843; Fax: +33-5-4636-3751. E-mail address: fberthe@ifremer.fr

SUMMARY

Marteilia refringens is a major pathogen of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linnaeus. Since its description, the life cycle of this protozoan parasite has eluded discovery. Attempts to infect oysters experimentally have been unsuccessful and led to the hypothesis of a complex life cycle involving several hosts. Knowledge of this life cycle is of central importance in order to manage oyster disease. However, the exploration of *M. refringens* life cycle has been previously limited by the detection tools available and the tremendous number of species to be screened in enzootic areas.

In this study, these two restrictions were circumvented by the use of both molecular detection tools and a mesocosm with low biodiversity. Screening of the entire fauna of the pond for *Marteilia refringens* DNA was systematically undertaken using PCR. Here, we show that the copepod *Paracartia* (*Acartia*) *grani* is a host of *M. refringens*. Not only was DNA of *M. refringens* consistently detected in *P. grani* but also the presence of the parasite in the ovarian tissues was demonstrated using in situ hybridisation. Finally, successful experimental transmissions provided evidence that *P. grani* can be infected from infected flat oysters.

Key Words: *Marteilia refringens*, *Ostrea edulis*, *Paracartia grani*, PCR, in situ hybridisation, experimental transmission.

INTRODUCTION

Marteilia refringens (Grizel *et al.* 1974), a major pathogen of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linnaeus, is responsible for important mortalities and economic losses in the oyster industry (Alderman, 1979; Figueras & Montes, 1988). During the past three decades of biological investigation, emergence of control strategies has been impeded by a major obstacle, which is elucidating the life cycle of this protozoan parasite. Early field observations led authors to suspect the involvement of other host species in the transmission of *M. refringens* (Balouet, 1979; Balouet, Cahour & Chastel, 1979; Balouet *et al.* 1979; Grizel, 1985; Lester, 1986). This hypothesis was further supported when authors repeatedly failed to infect healthy oysters with oyster-derived parasites after cohabitation, injection or feeding (Balouet, 1979; Balouet, Cahour & Chastel, 1979; Berthe *et al.* 1998). Although extensive efforts were made to identify potential hosts, these studies were strongly impeded by the technical limits of histology, transmission electron microscopy and immunohistochemistry as screening tools, and complicated by the hundreds or thousands of species present in enzootic areas (Balouet *et al.* 1979; Grizel, 1985).

In the present study, we circumvented the problem of species diversity by choosing particular natural oyster ponds, locally named “claires”, in the Marennes-Oléron Bay. Environmental characteristics of claires strongly limit the number of inhabiting species as compared with intertidal areas and oyster beds. Claires host less than 100 recognisable species (Reymond, 1991; Audemard *et al.* 2001), versus more than 1000 on open shores as Marennes-Oléron Bay (de Montaudouin & Sauriau, 2000). In addition, we recently developed a PCR-based tool allowing the detection of *Marteilia* DNA. Based on the sequence of the Small subunit Ribosomal RNA gene of *M. refringens*, specific polymerase chain reaction primers and *in situ* hybridisation probes were designed (Le Roux *et al.* 1999; Berthe *et al.* 2000). PCR and *in situ* hybridisation represent powerful tools for the detection of the parasite in potential hosts, because they are sensitive, rapid and independent of both developmental stages of the parasite and location in host species (Mialhe *et al.* 1995). Here, we first used PCR to screen every species sampled in the claire ponds for the presence of *M. refringens*. When consistent detection of *M. refringens* was observed in a given species, presence of the parasite was assessed using *in situ* hybridisation. Finally, experimental transmission of the parasite was performed to confirm involvement of the candidate species in the *M. refringens* life cycle.

MATERIALS AND METHODS

Study site

Clares in the Marennes-Oléron Bay (S-W France) are ponds with natural bottom traditionally used for growing oysters (Korringa, 1976). Ponds which were used in this study, were located on the East Coast of Ile d'Oléron in the central zone of the Bay (Audemard *et al.* 2001). Water temperatures ranged from 8°C in February to 25°C in summer. From May to late September, mean values were higher than the 17°C threshold necessary for infection of flat oysters by *M. refringens* (Grizel, 1985). Salinity ranged from 28 in spring (April) to 37 in summer (August). Species from the pond were sampled on a monthly or weekly basis for macrofauna, meiofauna, or zooplankton respectively (Audemard *et al.* 2001).

Screening by PCR

For each species sampled in the pond analysed individually or by batches in the case of small species, tissues were suspended in 10 volumes of extraction buffer (NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, pH8, SDS 0.5%) containing proteinase K (100 µg/ml). Following an overnight incubation at 50°C, DNA was extracted using a standard protocol involving phenol/chloroform, and precipitation with ethanol. PCR was performed as described by Le Roux *et al.* (1999), with two different primer pairs: one pair CS1/CAS1, was common to 50 eukaryotic species examined including *Marteilia* (universal primers) providing an internal control of amplification experiments. The other one, SS2/SAS1, was specific for *M. refringens* 18S rDNA (Berthe *et al.* 2000; Le Roux *et al.* 1999). PCR was performed in 50 µl with 10ng of purified DNA mixed with 5 µl of PCR buffer 10X, 5 µl of 25 mM MgCl₂, 5 µl of 2 mM of each dNTP, 0.5 µl of each primer at 100 µM and 0.25 µl (1 unit) of Taq DNA polymerase (Promega). Samples were overlaid with mineral oil, denatured for 5 min at 94°C and amplified by 30 cycles: 1 min at 94°C for denaturation, 1 min at 55°C for primers annealing, and 1min at 72°C for elongation in a thermal cycler apparatus (Appligene). Polymerisation at 72°C was then extended for 10 min to ensure completion of the amplified products.

In situ hybridisation

Animals were placed in Davidson's fixative AFA (10% glycerine, 20% formalin, 30% 95° ethanol, 30% H₂O, 10% glacial acetic acid) for at least 24 hours and then embedded in

paraffin. The sections were subsequently treated by conventional histological procedures. *In situ* hybridisation was performed as described by Le Roux *et al.* (1999). Sections were treated with proteinase K (100 µg/ml) in TE buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA), at 37°C for 20 min. Slides were dehydrated by immersion in an ethanol series and air dried. Sections were placed in 50 µl hybridisation buffer (4X SSC, 50% formamide, 1X Denhardt's solution, 250 µg/ml yeast tRNA, dextran sulphate 10%) containing 10 ng of the labelled probe. Two probes were used; 1) the digoxigenin-labelled probe, called Smart 2 specific for *M. refringens* and 2) a host probe, labelled with digoxigenin by PCR with universal primers and host DNA as template to assess the quality and accessibility of targeted nucleic acid (Le Roux *et al.* 1999). Sections were covered with *in situ* plastic coverslips and placed on a heating block at 95°C for 5 min. Slides were then cooled on ice for 1 minute before overnight hybridisation at 42°C in a humid chamber. Sections were washed twice for 5 min in 2x SSC at room temperature, and once for 10 min in 0.4x SSC at 42°C. The detection steps were performed according to manufacturer's instructions (Dig nucleic acid detection kit, Boehringer Mannheim).

Experimental infections

Uninfected oysters

Uninfected oysters, *Ostrea edulis* L., originating from the laboratory hatchery, were kept under laboratory conditions. Oysters were two years old at the time of the experiment. 30 oysters were checked at the time of the experiment for absence of *M. refringens* by means of digestive gland imprints.

Infected oysters

A batch of uninfected oysters originating from the laboratory hatchery, were placed in claire ponds during summer 1999 which led to their infection by *M. refringens*. They were then placed in laboratory tanks at 12°C until the beginning of the experiment in summer 2000. At this temperature, the parasite does not develop further in its flat oyster host and is not released into the environment (Berthe *et al.* 1998). Oysters were two years old at the time of the experiment. *M. refringens* prevalence in these oysters was 87%. Before the experiment, oysters shells were cleaned with a brush to remove epibionts.

Uninfected copepods

Uninfected copepods, *Paracartia (Acartia) grani*, were reared in the laboratory following previously described protocols (Guerrero & Rodriguez, 1998). A batch of fifty of these copepods were checked for the absence of *Marteilia refringens* by means of PCR, as described above.

Infected copepods

Infected copepods, *P. grani* from the claire pond, were sampled every 4 days from August to September 2000. In situ hybridisation was performed to test the presence of the parasite in *P. grani* on different sampling dates. Copepods were rinsed in filtered sea water and were directly added in tanks containing uninfected oysters.

Physical parameters of the experiments

The experimental and control tanks contained 20 litres of filtered sea water. During the experiments, they were kept in the laboratory under natural photoperiod with temperature ranging from 22 to 28 °C. Algal food (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros pumilum* and *Tetraselmis suecica*) was produced in the laboratory and added every day to each tank. Water from the tanks was partially renewed every 4 days with filtered seawater.

Trial 1: Oyster to copepod transmission

The experiment started on the 24th of July 2000 and lasted 25 days. This duration approximately corresponds to the longevity of an adult calanoid copepod stage.

Five infected flat oysters were placed on a 500µm mesh located in the upper part of the tank. The mesh minimised the effect of oyster filtration currents and allowed contact of *M. refringens* sporonts shed with oyster faeces with the copepods. Uninfected copepods were added to the tanks at the beginning of the experiment. Three replicates of the experiment were performed. During the experiment, copepod samples were preserved in Davidson fixative for further in situ hybridisation. The control experiment was designed as described above, but included uninfected flat oysters also placed on a mesh. Three replicates were performed.

Trial 2: Copepod to oyster transmission

Thirty uninfected flat oysters were placed on mesh in tanks. Copepods from the claire pond were added every 4 days, from August to September 2000. On 9 sampling dates of *P. grani* from the claire pond used in this trial, *M. refringens* was detected 3 times (on the 28th of

August, 4th and 11th of September) with prevalences below 12%. The experiment ended one month after the last copepods were added. At the end of the experiment, flat oysters were analysed by *in situ* hybridisation. Three replicates were performed. The control consisted of tanks containing 30 uninfected flat oysters as described above, but no copepods were added. At the end of the experiment, oysters were analysed by *in situ* hybridisation. Three replicates of the experiment were performed

RESULTS

Screening by PCR

The results are given in Table 1. For each species or taxon sampled in the claire pond, the number of individuals analysed is indicated in column 2. PCR was performed on individuals or groups of individuals with primers (column 3). The number of positive PCRs (assessing possible DNA amplification) is indicated in column 4. For each sample in which amplification had been obtained with CS1/CAS1 primers, PCR was performed with SS2/SAS1 primers specific for *M. refringens* and the number of positive detections is indicated in column 5.

Based on the PCR amplifications, four groups of species can be distinguished: the species showing 1/ no detection of *M. refringens*, 2/ very rare detection, 3/ consistent detection, or 4/ undetermined status (column 5).

Among the 62 taxa or species analysed by PCR, 36 taxa or species (Table 1) belonged to the first group (no detection) and eleven species belong to the second group (very rare detection). In the third group there were 2 species (the cnidarian *Cereus pedunculatus* and the copepod *Paracartia grani*), in which there was repeated detection. In the case of *C. pedunculatus*, *M. refringens* DNA was detected 48 times out of 273. Regarding *P. grani*, *M. refringens* DNA was detected in 5 batches out of 6. The last group consisted of 13 species where no DNA amplification had been obtained by PCR, when performed with universal primers.

In situ hybridisation

Given the consistent detection of *M. refringens* DNA in *C. pedunculatus* and *P. grani*, *in situ* hybridisation was performed with Smart2 probe in order to localise the parasite in potential host tissues.

Cereus pedunculatus

No hybridisation was observed with Smart2 in the tissues of 70 *C. pedunculatus* analysed (result not shown). Quality and accessibility of targeted nucleic acid was assessed by controls.

Paracartia grani

Observations were made on copepodid (juveniles) and adult stages. Hybridisation with Smart2 was observed within the tissues of *P. grani*. The parasite was detected (brown staining) in copepodid and adult females and located in the ovary (Fig. 1A, B, C). *M. refringens* was never detected in male copepods. The maximum prevalences of the parasite were 26%, (n=85) in copepodid females and 23 % (n=66) in adult females in August.

Experimental transmission of Marteilia refringens

Trial 1

After 7 days of cohabitation with infected flat oysters as described above, females of *P. grani* were infected by *M. refringens* with a prevalence of 3% (n=65). During the experiment, the prevalence ranged from 1.5 (n=65) to 3% (n=33, Table 2) depending on the day of experiment (Table 2). Oysters and both male and female copepods from the controls remained uninfected during the experiment.

Trial 2

After 72 days of cohabitation with copepods sampled in the claire pond, the 90 flat oysters from the trial remained uninfected when analysed by *in situ* hybridisation.

DISCUSSION

Marteilia refringens belongs to the phylum Paramyxea, which contains protistan parasites, infectious for marine invertebrates (Desportes & Perkins, 1990; Berthe *et al.* 2000). Paramyxean parasites are characterised by the formation of spores consisting of several cells enclosed inside one another, which result from internal cleavage within a stem cell. In the phylum Paramyxea, the species *M. refringens* in Europe and *M. sydneyi*, a parasite of *Crassostrea glomerata* (*Saccostrea commercialis*) in Australia (Perkins & Wolf, 1976; Adlard & Ernst, 1995) have been extensively studied but their life cycle has remained uncharacterised.

As an approach to identifying potential host species participating in the transmission of *M. refringens*, we performed an exhaustive screening of the fauna of Claire Pond. Using PCR amplification of *M. refringens* DNA, we distinguished four groups of species: species where the parasite DNA was never, occasionally, or consistently amplified, as well as species where DNA amplification had not been obtained (even using universal primers). The distinction between these four groups allowed species presenting consistent detection of the parasite to be selected as the most probable candidates as *M. refringens* hosts. To draw conclusions on the status of a species as a host of *M. refringens*, several parameters have to be taken into account, such as the number of individuals sampled, the number of analyses performed, possible DNA amplification, and the presence of the parasite. For example, a limited number of individuals showing poor DNA amplification and no detection of the parasite does not allow a decision on the status (potential host or not) of the species.

The first limiting factor can be seen in the number of individuals sampled. This number mainly depends on the abundance of the species in the Claire biotope and on the sampling strategy (Table 1). As a consequence, it was difficult to decide on the status of scarce species such as *Anguilla anguilla*, platyhelminth species, *Amphipholis squamata*, *Chlamys varia*, *Haliplanella luciae*, *Nephtys humbergii*, chaetognath species, *Pseudopolydora antennata*, *Doris verrucosa*, *Eulalia veridis*, *Cerastoderma edule*, Ephyridae, *Facellina coronata*, or *Polydora ciliata*. For these species, additional efforts should be made on the sampling frequency in order to increase the number of animals to be analysed. Nevertheless, if these species were infected by *M. refringens*, one can assume that the naturally low abundance of animals should be balanced by a higher parasite prevalence and infection level, therefore allowing the detection of *M. refringens* in the course of this study.

A second limiting factor is the number of analyses performed. For small size species, (especially species from the meiofauna and zooplanktonic species), DNA extraction was realised on a pool of individuals. This could result in a dilution of the targeted DNA (i.e. *M. refringens* DNA) and, possibly induce an underestimate of the parasite presence. As an example, in the case of Harpacticoid copepods, pooling reduced 862 sampled individuals into 17 performed analyses. On the other hand, reducing 285 individuals of *P. grani* to 8 analyses resulted in 5 positive PCR.

The third limitation encountered during this study, came from the absence or the low rate of DNA amplification during PCR when performed with universal primers. The absence of DNA amplification could be explained by the presence of inhibitory factors contained in the shell of crustaceans or molluscs (Wilson, 1997; Le Roux *et al.* 1999). For example, shells of

the shrimp *Palaemon serratus* were removed during this study, and led to a substantial improvement of the PCR reaction. However, shells of small crustaceans (*Corophium volutator*, *Idothea chelipes*), insects (Ephydriidae) or molluscs (*Abra segmentum*, *Hydrobia ulvae*) could not be removed because of their small size, and they probably inhibited PCR amplification. For some species such as *Hediste diversicolor*, and *Carcinus maenas* the low rate of DNA amplification probably resulted from DNA degradation. In future studies, the time between sampling and samples preservation (which could last for 3 hours due to the sorting of species) would have to be shortened to avoid DNA degradation. Similarly, alternative DNA extraction methods would have to be tested (Ferraris & Palumbi, 1996).

Finally, the absence of detection of *M. refringens* can be seen as a failure of the overall strategy (sampling and screening). When taking into account the different factors cited above, most of the species included in this study cannot be firmly excluded from the hypothetical life cycle. In contrast, the consistent detection of the parasite obtained in *P. grani* and *C. pedunculatus* strongly supported the hypothesis of their involvement in *M. refringens* life cycle.

In order to discriminate between true parasitism and presence of *M. refringens* in the digestive tract or on the body surface, *in situ* hybridisation was performed to localise the parasite in tissue sections. *In situ* hybridisation experiments demonstrated presence of *M. refringens* in the ovary of *P. grani*. The ovarian tissue was frequently observed to be overwhelmed by *M. refringens* in the form of large numbers of small cells within oocytes. Observed stages of *M. refringens* in *P. grani*, appeared to be morphologically different from the known stages observed in oyster digestive gland, although further transmission electron microscopy studies are obviously needed to characterise these developmental stages. The ovarian location of *M. refringens* may be surprising. However other paramyxean parasites are known to target gonads of marine invertebrates: *Marteilioides chungmuensis* in *Crassostrea gigas* (Comps, Park & Desportes, 1986) and *Paramarteilia orchestiae* in *Orchestia gammarellus* (Ginsburger-Vogel & Desportes, 1979). The ovary appears during the moult of the first copepodid stage and keep developing until the sexually mature adult stage (Schram, 1986). Infestation of the ovaries of some copepods has already been described in the case of microsporidian parasites (Andreadis, 1988; Micieli, Garcia & Becnel, 2000) and infection of ovarian tissues does not seem to impede seriously normal metabolic processes (Andreadis, 1988).

Involvement of *P. grani* in the life cycle of *M. refringens* seems consistent with both the ecology of this copepod and the epidemiology of the disease. *Paracartia grani* is mainly observed in bays and estuaries during spring and summer season (Alcaraz, 1983; Rodriguez & Jimenez, 1990; Rodriguez, Guerrero & Bautista, 1995; Guerrero & Rodriguez, 1998) as it is the case in the claire ponds where it may represent 100% of the total copepod abundance. The seasonal cycle of *M. refringens* appears to match the life cycle of *P. grani*, as it was shown that transmission occurs during summer (Grizel & Tigé, 1977; Grizel, 1985). During winter, sporangia primordia of *M. refringens* observed in flat oysters do not develop. In spring, increase of water temperature fosters *M. refringens* development (Balouet, 1979; Berthe *et al.* 1998). Similarly, *P. grani* is absent from the water during winter (Rodriguez & Jimenez, 1990; Rodriguez, Guerrero & Bautista, 1995; Guerrero & Rodriguez, 1998) to reappear in spring from resting benthic eggs. These eggs could play a role in overwintering of the parasite as reservoir for the parasite which will be investigated in future studies.

The geographical range of *P. grani* also matches *M. refringens* distribution. In Europe, marteiliosis has been reported to be restricted to north-western Brittany, the Bay of Biscay and the Mediterranean Sea, including the Atlantic coasts of Spain and the Adriatic coasts of Italy and Croatia. *Paracartia grani* is a warm temperate species originating from the tropical and temperate Atlantic coast. It is a calanoid copepod typical of coastal, semi-confined ecosystems, conditioned by instability of both physical parameters (temperature and salinity) and biological conditions (quality and quantity of available food). This species is often observed in the vicinity of oyster beds (Gallo, 1981) and has been observed within the geographical range of the disease; in estuaries or bays where the parasite has been reported (Lubet, 1953; Paulmier, 1965; Paulmier, 1969; Alcaraz, 1983; Elbée (D') and Castel, 1995; Siokou-Frangou *et al.* 1997; Razouls & Bovée, 1999).

Determination of the role of *P. grani* in the life cycle of *M. refringens* requires further experimental validation. Transmission of *M. refringens* from flat oysters to copepods was proved to be effective and rapid, as it was detected after seven days of exposure to infected oysters (Table 2). However, the prevalence of *M. refringens* in *P. grani* obtained by the experimental transmission was low. This could be due to a weak inoculum of parasites since the source of *M. refringens* consisted of oysters previously maintained at 12°C and placed in experimental aquaria. They experienced a sharp increase of water temperature, which induced a synchronous release of sporangia in the faeces (Berthe *et al.* 1998). Consequently, the experimental design may have led to a unique flash of parasites, while a continuous release of

parasite sporangia may occur under natural conditions. We therefore cannot assume that experimental conditions were optimal for transmission of the parasite from oysters to copepods.

No transmission of *M. refringens* was observed from copepods to oysters in our experiments. This also could result from non optimal experimental conditions. The source of parasite may have been too weak to enable transmission. Presence of *M. refringens* in females of *P. grani* sampled in the summer 2000 was rare and the prevalence was low (less than 12 %). In 2000, both copepods and oysters from the claire pond exhibit low prevalence of *M. refringens* as compared with the previous year where prevalence in adult copepods and oysters was respectively of 26% and 87%.

The absence of parasite transmission in trial 2 could also reflect the involvement of a third species in the life cycle of *M. refringens*. When considering this hypothesis, a candidate was *C. pedunculatus* in which the parasite was recurrently detected. *In situ* hybridisation performed on 70 individuals never demonstrated *M. refringens* in tissues of *C. pedunculatus*. Consequently, detection of the parasite by PCR could be attributed to phoresy or ingestion of sporangia, infected copepods, or free -living stages of *M. refringens* because cnidarians are non-selective feeders (Van Praët, 1985). Among the 273 PCRs performed (see Table 1, column 4), 45 out of 190 (23%) were positive when *C. pedunculatus* was sampled on oysters while 3 out of 83 (4%) when sampled on the sediment of the claire pond (data not shown). Thus, detection of the parasite DNA in *C. pedunculatus* seems to be correlated with the geographic distance from *M. refringens* infected oysters. However, considering recurrent detection of the parasite, we can not exclude that *C. pedunculatus* may play a role in the *M. refringens* life cycle, for example, in allowing capacitation or maturation of the parasite within the digestive cavity of this species. Future transmission experiments would have to investigate the role of this species in the *M. refringens* life cycle.

From a more general point of view, the case of the cnidarian *C. pedunculatus* illustrates the confinement situation of claire ponds. In this ecosystem, species leading to occasional detection of *M. refringens* are numerous (Table 1) and it is difficult to discriminate accidental carriers from inconspicuous hosts. In the claire, *M. refringens* is present in oysters and copepods, as well as in sporangia released within oyster faeces. Other stages of *M. refringens* may exist, as free living stages or within copepod eggs. *M. refringens* may be part of the food web of the claire pond, directly or indirectly. Considering the size of *M. refringens* sporangia ranging from 9 to 19 μm (Grizel *et al.* 1974; Perkins & Wolf, 1976), they could potentially be

ingested by various pond microphageous species, including decapod larvae, copepods (cyclopoids, *Canuella perplexa* and *Euterpina acutifrons*), and ostracods (Dussart & Defaye, 1995; Vannier, Abe & Ikuta, 1998). The parasite could also be present within the digestive tract of annelid *Streblospio* spp., as they feed at the water interface upon suspended, resuspended and deposited material where the parasite can be present (Dauer, Maybury & Ewing, 1981). Nemertean (*Lineus* spp.) or fish, *Pomatochistus* sp, may ingest not only free living stages but also infected copepods. Phoresy of the parasite on the body surface may also explain occasional detection of the parasite. Basically, as *M. refringens* may be present on the sediment (at least as sporangia within oyster faeces) and in the water column, transport is conceivable by any benthic or pelagic species. If experimental transmissions from *P. grani* to *O. edulis* recurrently fail, these species will have to be studied further as potential host of *M. refringens*.

CONCLUSIONS

In the course of this study, we demonstrated that at least two species are involved in the life cycle of *M. refringens*: *O. edulis* and *P. grani*. Transmission experiments between *O. edulis* and *P. grani* were successful, demonstrating that the two species are contiguous in life cycle of the parasite. First attempts of reverse transmission failed. Design of this experiment should be improved by enhancing the inoculum of *M. refringens*. This could be achieved by improving transmission rate from oysters to copepods reared in the laboratory or relying on better environmental conditions to increase naturally prevalence in copepods populations.

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful for the contributions of S. Bodin, B. Chollet and the staff of the “Centre Régional d’Expérimentation et d’Application Aquacole” for their technical assistance. Authors would like to thank M-C. Sajus, M. Lucas and E. Morin for their involvement during the screening of the fauna and M. Audemard for adding her English touch. This study was supported by the European Community funding under the FAIR programme, project MARS (FAIR CT/PL97-3640).

REFERENCES

- ADLARD, R. D. & ERNST, I. (1995). Extended range of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* **15**, 119-121.
- ALCARAZ, M. (1983). Coexistence and segregation of congeneric pelagic Copepods, spatial distribution of the *Acartia* complex in the ria of Vigo (NW Spain). *Journal of Plankton Research* **5**, 891-900.
- ALDERMAN, D. J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Marine Fishery Review* **41**, 67-69.
- ANDREADIS, T. G. (1988). Comparative susceptibility of the copepod *Acanthocyclops vernalis* to a Microsporidian parasite, *Amblyospora connecticus*, from the mosquito *Aedes cantator*. *Journal of Invertebrate Pathology* **52**, 73-77.
- AUDEMARD, C., BARNAUD, A., COLLINS, C. M., LE ROUX, F., SAURIAU, P.-G., COUSTAU, C., BLACHIER, P. & BERTHE, F. C. J. (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies : new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **257**, 87-108.
- BALOUET, G. (1979). *Marteilia refringens* - Considerations of the life-cycle and development of Aber disease in *Ostrea edulis*. *Marine Fishery Review* **41**, 64-66.
- BALOUET, G., CAHOUR, A. & CHASTEL, C. (1979). Epidémiologie de la maladie de la glande digestive de l'huître plate : hypothèse sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis* **8**, 323-326.
- BALOUET, G., CHASTEL, C., CAHOUR, A., QUILLARD, A. & PODER, M. (1979). Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. *Sciences et Pêche, Bulletin de l'Institut des Pêches maritimes* **289**, 13-22.
- BERTHE, F. C. J., PERNAS, M., ZERABIB, M., HAFFNER, PH., THÉBAULT, A. & FIGUERAS, A. J. (1998). Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life-cycle. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**, 135-144.
- BERTHE, F. C. J., LE ROUX, F., PEYRETAILLADE, E., PEYRET, P., RODRIGUEZ, D., GOUY, M. & VIVARES, C. P. (2000). Phylogenetic analysis of the small unit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of the phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**, 288-293.
- COMPS, M., PARK, M. S. & DESPORTES, M. S. (1986). Etude ultrastructurale de *Marteilioides chungmuensis* n.g., parasite des ovocytes de l'huître *Crassostrea gigas* Th. *Protistologica* **22**, 279-285.

- DAUER, D. M., MAYBURY, C. A. & EWING, R. M. (1981). Feeding behavior and general ecology of several Spionid Polychaetes from the Chesapeake bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **54**, 21-38.
- DESPORTES, I. & PERKINS, F. O. (1990). Phylum Paramyxea. In: *Handbook of Protozoista* Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J. (ed. Jones & Bartlett Publishing Corporation), pp. 30-35. Boston.
- DUSSART, B. H. & DEFAYE, D. (1995). *Copepoda: Introduction to the Copepoda (Guides to the identification of the Macroinvertebrates of the Continental Waters of the World*, eds. H.J.F. Dumont.
- ELBÉE (D'), J. & CASTEL, J. (1995). Evolution spatio-temporelle du zooplancton dans le bassin d'Arcachon: le rôle des variables de milieu. *Cahiers de Biologie Marine* **36**, 33-45.
- FERRARIS, J. D. & PALUMBI, S. R. (1996). *Molecular zoology: Advances, strategies and protocols*. John Wiley and Sons, New York, USA.
- FIGUERAS, A. J. & MONTES, J. (1988). Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *American Fisheries Society Special Publication* **18**, 38-46.
- GALLO, J.-M. (1981). Les copépodes pélagiques de la Rochelle. *Annales de la Société des Sciences Naturelles de la Charente-Maritime* **6**, 847-850.
- GINSBURGER-VOGEL, T. & DESPORTES, I. (1979). Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramarteilia orchestiae* gen. n. sp.n. parasite de l'amphipode *Orchestia gammarellus*. *Marine Fishery Review* **41**, 3-7.
- GRIZEL, H. (1985). *Etude des récentes épizooties de l'huître plate Ostrea edulis Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne*. PhD thesis University of Science, Montpellier.
- 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* Linné. *Sciences et Pêche Bulletin de l'Institut des Pêches maritimes* **240**, 7-30.
- GRIZEL, H. & TIGÉ, G. (1977). Observations sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis* **8**, 327-330.
- GUERRERO, F. & RODRIGUEZ, V. (1998). Existence and significance of *Acartia grani* resting eggs (Copepoda: Calanoida) in sediments of a coastal station in the Alboran Sea (SE Spain). *Journal of Plankton Research* **20**, 305-314.
- KORRINGA, P. (1976). Farming the cupped oysters of the genus *Crassostrea*. A multidisciplinary treatise. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 2, Elsevier Scientific Publication Compilation, Amsterdam.

- LE ROUX, F., AUDEMARD, C., BARNAUD, A., GOUY, M. & BERTHE, F. C. J. (1999). Specific molecular probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* **1**, 588-597.
- LESTER, R. J. G. (1986). Field and laboratory observations on the oyster parasite *Marteilia sydneyi*. In *Parasite Lives*. (ed. Cremin, M; Dobson, C., & Moorhouse, D.E.), pp33-40. University of Queensland Press, Brisbane.
- LUBET, P. (1953). Variations saisonnières du zooplancton du bassin d'Arcachon. *Bulletin de la société zoologique de France* **78**, 204-216.
- MIALHE, E., BACHERE, E., BOULO, V., CADORET, J. P., SARAIVA, J., CARRERA, L., ROUSSEAU, C., CEDENO, V., CALDERON, J. & COLWELL, R. R. (1995). Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* **4**, 275-283.
- MICIELI, M. V., GARCIA, J. J. & BECNEL, J. J. (2000). Horizontal transmission of *Amblyospora albifasciati* Garcia and Becnel, 1994 (Microsporidia : Amblyosporidae), to a copepod intermediate host and the neotropical mosquito, *Aedes albifasciatus* (Macquart, 1837). *Journal of Invertebrate Pathology* **75**, 76-83.
- De MONTAUDOUIN, X. & SAURIAU, P-G. (2000). Contribution to a synopsis of marine species richness in the 'Pertuis Charentais Sea' with new insight in soft-bottom macrofauna of the Marennes-Oléron Bay. *Cahiers de Biologie Marine* **41**, 181-222.
- PAULMIER, G. (1965). Le microplancton de la rivière d'Auray. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* **29**, 211-223.
- PAULMIER, G. (1969). Le microplancton des rivières de Morlaix et de la Penzé. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* **33**, 311-332.
- PERKINS, F. O. & Wolf, P. H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. – Haplosporidian pathogen of Australian oysters. *Journal of Parasitology* **62**, 528-538.
- RAZOULS, C. & De BOVÉE, F. (1999). Diversité et répartition géographique chez les Copépodes planctoniques marins. <http://www.obs-anyuls.fr/Copepodes/RAZOULS1.htm>
- REYMOND, H. (1991). *Dynamique de la chaîne hétérotrophe benthique des marais maritimes en période estivale et son impact sur les productions aquacoles de carnivores : Penaeus japonicus, un modèle d'étude*. PhD thesis, University of Paris VI.
- RODRIGUEZ, V., GUERRERO, F. & BAUTISTA, B. (1995). Egg production of individual Copepods of *Acartia grani* Sars from coastal waters : seasonal and diel variability. *Journal of Plankton Research* **17**, 2233-2250.

- RODRIGUEZ, V. & JIMENEZ, F. (1990). Co-existence of congeneric species of *Acartia* (Copepoda Calanoida): sexual dimorphism and ecological niche in *Acartia grani*. *Journal of Plankton Research* **12**, 497-511.
- SCHRAM, F. R. (1986). *Crustacea*. Oxford University Press, New York, USA.
- SIOKOU-FRANGOU, I., PAPATHANASSIOU, E., LEPRETRE, A. & FRONTIER, S. (1997). Zooplankton assemblages and influence of environmental parameters on them in a Mediterranean coastal area. *Journal of Plankton Research* **20**, 847-870.
- VANNIER, J., ABE, K. & IKUTA, K. (1998). Feeding in myodocopid ostracods: functional morphology and laboratory observations from videos. *Marine Biology* **132**, 391-408.
- VAN PRAËT, M. (1985). Nutrition of Sea Anemones. *Advances in Marine Biology* **22**, 65-99.
- WILSON, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 3741-3751.

Table 1 : Screening by PCR of the total fauna sampled in the claire pond model.

Results of the screening by PCR of species sampled in the claire pond. PCR was first performed with “universal” primers (PCR CS1/CAS1) and, in the case of amplification, with SS2/SAS1 primers. “A”: Ascidia, “An” : Annelida, “C”: Crustacea, “Ch”: Chaetognatha, “Cn”: Cnidaria “E”: Echinodermata, “F”: Pisces, “I”: Insecta, “M”: Mollusca, “N”: Nematoda, “Ne”: Nemertea, “Pl”: Plathyheminthes.

Genus species	Number of individuals analysed	Number of PCRs using CS1/CAS1 primers	Number of positives with CS1/CAS1 primers	Number of PCRs using SS2/SAS1 primers	Group
<i>Microdeutopus grillotalpa</i> (C)	731	61	49	0/49	1
<i>Palae monetes varians</i> (C)	287	53	44	0/44	1
<i>Pomatochistus microps</i> (F)	250	44	42	0/42	1
<i>Orchestia gammarella</i> (C)	140	53	37	0/37	1
<i>Hediste diversicolor</i> (An)	496	117	28	0/28	1
<i>Gammarus insensibilis</i> (C)	146	29	27	0/27	1
<i>Paleomon serratus</i> (C)	190	38	26	0/26	1
Harpacticoïd spp. (C)	862	17	15	0/15	1
<i>Corophium achuresicum</i> (C)	334	16	15	0/15	1
<i>Notomastus latericeus</i> (An)	133	15	15	0/15	1
<i>Melita palmata</i> (C)	201	27	14	0/1	1
<i>Hydrobia ventrosa</i> (M)	462	16	12	0/12	1
Decapod larvae (zoé I) (C)	204	15	12	0/12	1
<i>Holothuria</i> sp. (E)	242	11	11	0/11	1
<i>Corophium</i> sp. (C)	102	20	8	0/8	1
Nematoda spp. (N)	514	10	8	0/8	1
<i>Balanus improvisus</i> (C)	30	7	7	0/7	1
<i>Tubificoides benedeni</i> (An)	47	7	7	0/7	1
<i>Leucophytia bidentata</i> (M)	56	14	6	0/6	1
<i>Hydrobia ulvae</i> (M)	129	21	6	0/6	1
<i>Spionidae</i> sp. (An)	39	6	4	0/4	1

<i>Anguilla anguilla</i> (F)	4	4	4	0/4	1
Gastropod Larvae (M)	116	4	4	0/4	1
<i>Platyhelminth</i> spp. (Pl)	14	4	4	0/4	1
<i>Acartia discaudata</i> (C)	42	2	2	0/2	1
<i>Amphipholis squamata</i> (E)	7	2	2	0/2	1
<i>Chlamys varia</i> (M)	2	2	2	0/2	1
<i>Haliplanella luciae</i> (Cn)	2	2	2	0/2	1
<i>Nephtys humbergii</i> (An)	4	2	2	0/2	1
Ascidian Larva (A)	14	2	1	0/1	1
Polychaeta Annelid Larva (An)	49	2	1	0/1	1
<i>Acartia bifilosa</i> (C)	35	1	1	0/1	1
Chaetognath sp. (Ch)	9	1	1	0/1	1
<i>Pseudopolydora antennata</i> (An)	8	1	1	0/1	1
<i>Alkmaria romijni</i> (An)	349	16	1	0/1	1
<i>Abra tenuis</i> (M)	32	5	1	0/1	1
<i>Molgula manhattensis</i> (A)	167	116	112	1/112	2
<i>Lineus gisserensis</i> (Ne)	118	35	24	4/24	2
Decapod larvae (zoe II) (C)	570	28	23	1/23	2
<i>Canuella perplexa</i> (C)	966	19	19	1/19	2
<i>Haminoea hydatis</i> (M)	161	24	15	1/15	2
Juveniles of <i>Pomatochistus microps</i> (F)	282	17	15	3/15	2
Cyclopoid spp. (C)	362	15	14	1/14	2
<i>Euterpina acutifrons</i> (C)	362	15	14	2/14	2
Ostracod spp. (C)	287	10	10	1/10	2
<i>Streblospio shrubsolii</i> (An)	44	8	6	1/6	2
<i>Abra segmentum</i> (M)	166	29	2	1/2	2
<i>Cereus pedunculatus</i> (Cn)	732	345	273	48/273	3
<i>Paracartia grani</i> (C)	285	8	6	5/6	3
<i>Corophium volutator</i> (C)	32	6	0	ND	4
<i>Chironomus salinarius</i> (I)	30	3	0	ND	4

<i>Praunus flexuosus</i> (C)	23	1	0	ND	4
<i>Idothea chelipes</i> (C)	22	5	0	ND	4
<i>Carcinus maenas</i> (C)	13	13	0	ND	4
<i>Crangon crangon</i> (C)	11	6	0	ND	4
Isopod sp. (C)	8	2	0	ND	4
<i>Doris verrucosa</i> (M)	5	5	0	ND	4
<i>Eulalia veridis</i> (An)	3	1	0	ND	4
<i>Cerastoderma edule</i> (M)	2	2	0	ND	4
<i>Ephydridae</i> sp. (I)	1	1	0	ND	4
<i>Facellina coronata</i> (M)	1	1	0	ND	4
<i>Polydora ciliata</i> (An)	1	1	0	ND	4

Table 2 : Results of the experimental transmission of *Marteilia refringens* from infected oysters to *Paracartia grani*

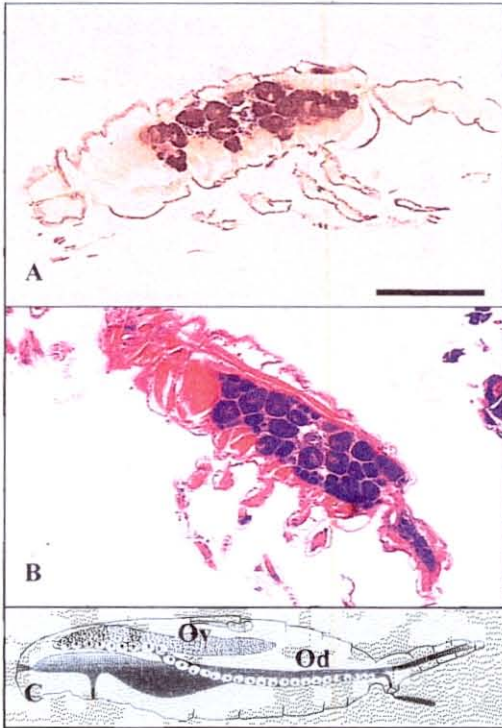
Results of the experimental transmission of the parasite *Marteilia refringens* between infected flat oysters and uninfected copepods. Prevalence of the parasite obtained by *in situ* hybridisation on female copepods from the trial and the control (with the number of infected animals/ the total number of females analysed). Disappearance of copepod was noted in the control the 17th and 25th days of experiment.

Time of exposure of copepods to flat oysters (day)	Prevalence of <i>M. refringens</i> in copepods from the control	Prevalence of <i>M. refringens</i> in copepods from the trial
0 (beginning of the experiment)	0% (0/60)	0% (0/60)
3	0% (0/44)	0% (0/30)
7	0% (0/41)	3% (2/65)
10	0% (0/17)	1.5% (1/65)
17	No copepod	3% (1/33)
25	No copepod	0% (0/10)

Figure caption:

Figure 1:

Slides of a female *Paracartia grani* treated by in situ hybridisation with Smart 2 probe (A), and treated for conventional histology (Hemalum Eosin) (B). Schematic representation of a female copepod reproductive system (C) with the germinal site of ovary (ov) and oviduct (od). On each figure, the anterior part of the copepod is on the left. (scale bar, 250µm).



Cinquième partie :

Dynamique de *Marteilia refringens* dans le modèle claire

D'après nos résultats, le cycle de vie de *Marteilia refringens* implique au minimum deux espèces le copépode *Paracartia grani* et l'huître plate *Ostrea edulis*. Cette 5^{ème} partie concerne la dynamique du parasite chez ces hôtes et les interactions avec les paramètres environnementaux de notre modèle d'étude. L'étude de l'évolution des intensités parasitaires et la détermination de la période d'infection permettent de mettre en évidence la dynamique du parasite chez les huîtres. La dynamique du parasite chez le copépode est abordée grâce à l'étude de la dynamique de cette espèce au sein de la claire (et par rapport à d'autres espèces de copépodes *Acartidae*) et grâce aux détections d'ADN du parasite obtenues par PCR sur des prélèvements de ce copépode.

L'étude des interactions entre *M. refringens*, ses hôtes et l'environnement est plus facilement réalisable dans les claires que dans une baie ou un estuaire. La claire est un écosystème de faible surface et de faible profondeur où la dimension spatiale est extrêmement simplifiée par rapport à des écosystèmes moins confinés. Dans de tels écosystèmes, la profondeur est variable et plusieurs masses d'eau sont présentes influençant la répartition des espèces planctoniques. De plus, les facteurs physico-chimiques tels que la température et la salinité ne sont pas uniformes et varient en fonction des masses d'eaux et de la profondeur.

La claire est un système semi-ouvert ce qui permet la pénétration d'espèces du bassin de Marennes-Oléron. L'étude des espèces du zooplancton présentes dans la claire, met en évidence cette relation avec le bassin. L'étude des copépodes *Acartidae* montre la présence d'une espèce néritique au printemps, *Acartia clausi*, et d'une espèce estuarienne en automne, *Acartia bifilosa*. En été, lorsque les paramètres environnementaux deviennent plus sélectifs vis-à-vis des espèces, seules *Acartia discaudata* et *P. grani* peuvent survivre.

Paracartia grani est l'espèce dominante au sein des *Acartidae* et peut représenter 50% de l'ensemble des copépodes planctoniques. Elle présente un cycle saisonnier très marqué, n'apparaissant au sein de la claire qu'à partir de la fin mars et pouvant atteindre des abondances très importantes au cours de la période estivale. Ce cycle de vie saisonnier est comparable au cycle de vie de *M. refringens* chez l'huître. Les températures printanières favorisent la reprise du cycle de développement chez l'huître et l'éclosion des œufs de durée

de *P. grani*. Pendant la période estivale, les intensités parasitaires observées chez les huîtres sont maximales, induisant une libération de sporanges proportionnelle, au moment où *P. grani* est l'une des espèces dominantes du zooplancton. La détection par PCR d'ADN de *M. refringens* chez *P. grani* pendant la période estivale peut être corrélée à l'abondance des sporanges dans l'environnement.

La présence d'ADN de *M. refringens* chez *P. grani* est aussi observée après la période d'infection des huîtres. Ces données mettent en évidence que la transmission du parasite du copépode vers l'huître ne dépend pas seulement de la présence conjointe des sporanges et du copépode dans l'environnement. Le cycle du parasite semble être «bloqué» par d'autres facteurs qui pourraient avoir un impact sur la forme du parasite infestante pour l'huître, sur les huîtres elles-mêmes en les rendant moins prédisposées à l'infection. De plus, il faut noter qu'expérimentalement, le parasite n'a jamais pu être transmis du copépode vers l'huître, ce qui ne nous permet pas d'exclure l'implication d'autres espèces hôtes dont l'absence au sein de la baie de l'automne au printemps pourrait bloquer le cycle de *M. refringens*.

Cette étude ne nous permet pas de statuer sur un impact potentiel de *M. refringens* sur la dynamique des populations de *P. grani*. Des études expérimentales pourraient permettre d'évaluer cet impact avant de tester ces résultats sur des milieux plus complexes.

Ce travail a fait l'objet d'un article actuellement soumis pour publication dans le Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Une copie de cet article est fournie à la suite de cette introduction.

Article soumis au Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

Infection dynamics of *Marteilia refringens* in the flat oyster *Ostrea edulis* and the copepod *Paracartia grani* in ponds of Marennes-Oléron bay

C. Audemard^a, M.-C. Sajus^b, A. Barnaud^a, B. Sautour^b, P.-G. Sauriau^c, F. Berthe^a.

^a Laboratoire Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 133, F- 17390 La Tremblade, France

^b Laboratoire d'Océanographie Biologique, UMR 5805- Université Bordeaux I - CNRS, 2, rue du Professeur Jolyet, F-33120 Arcachon, France

^c Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture, CREMA (CNRS-Ifremer) B.P.5, F- 17137 L'Houmeau, France

Abstract

Marteilia refringens is a protozoan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis*. The parasite has been responsible of severe flat oyster production decrease since the seventies. Involvement of the Acartidae copepod *Paracartia grani* as an host of *M. refringens* was recently demonstrated by combining molecular detection tools of *M. refringens* and screening of species inhabiting particular ponds for oyster culture characterised by their low species richness.

In this study, we investigated *M. refringens* dynamic in its two known hosts, *O. edulis* and *P. grani*. Study of *P. grani* population dynamic in the claire and comparison with other Acartidae species demonstrated that this species is clearly dominant in this confined ecosystem. Its summer abundance matches the infection period of oyster by *M. refringens* which was demonstrated to be limited a three months period, from May to end of August. Moreover, detection of *M. refringens* within *P. grani* sampled in the summer autumn period (from May to July in 1998 and from July to October in 1999), appeared to be linked to the release of parasite sporangia by the oyster. This support previous experimental results demonstrating that transmission of the parasite from the oyster to the copepod is effective.

Key words: *Marteilia refringens*, *Paracartia grani*, *Ostrea edulis*, pond, life cycle.

Introduction

Marteilia refringens (Grizel et al., 1974), a major pathogen of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linnaeus, is responsible for important mortalities and economical losses in the oyster industry (Alderman, 1979; Figueras and Montes, 1988). During the past three decades of biological investigation, emergence of control strategies has been impeded by a major obstacle, which is elucidating the life cycle of this protozoan parasite.

Recently, it has been demonstrated that at least two species are involved in the life cycle of *Marteilia refringens*: the European flat oyster *Ostrea edulis* and the copepod *Paracartia grani* (Audemard et al., in press). Transmission experiments between *O. edulis* and *P. grani* were successful, demonstrating that the two species are contiguous in the life cycle of the parasite. In *O. edulis*, the parasite infects the digestive gland. In *P. grani*, in situ hybridisation experiments demonstrated that the parasite development would occur within the ovarian tissue (Audemard et al., in press).

Those new result were obtained by surpassing two major limits that had restricted previous life cycle studies (Balouet et al., 1979; Grizel, 1985). Those limits were 1) the considerable number of species to be analysed in endemic zones and 2) the lack of appropriate detection tools which could allowed the detection of the parasite whatever its developmental stage and its host(s).

We circumvented the problem of species diversity by choosing particular oyster ponds, named claires, in the Marennes-Oléron Bay. Environmental characteristics of the ponds strongly limit the number of inhabiting species as compared to intertidal areas and oyster beds. Claires host less than 100 recognisable species including macrofauna, meiofauna and zooplankton (Reymond, 1991; Audemard et al., 2001), versus more than 1000 on open shore at Marennes-Oléron Bay (Montaudouin (de) and Sauriau, 2000).

Recently, based on the sequence of the Small Subunit Ribosomal RNA of *Marteilia refringens*, specific polymerase chain reaction primers and in situ hybridisation probes were designed (Le Roux et al., 1999; Berthe et al., 2000). These techniques represent powerful detection tools of the parasite in potential hosts, because they are sensitive, rapid and independent of both developmental stages of the parasite and host species location (Mialhe et al., 1995). PCR was the first techniques involved and was in the screening for *M. refringens* among all the species sampled in the claire. In situ hybridisation was used to localise on tissue slide the parasite DNA detected during PCR. The detection of *M. refringens* by PCR in the

copepod *P. grani* was attributed to a case of parasitism as demonstrated by in situ hybridisation and experimental essay.

To obtain a functional and dynamic representation of *M. refringens* life cycle we studied parasite dynamic in the copepod (in terms of parasite DNA detection by PCR) and in the flat oyster (in terms of parasitism intensity and infection period) within our study model.

Paracartia grani dynamic was also compared to the dynamic of the total planctonic copepods, copepodids and nauplii of Calanoid copepods and to other Acartidae species present in this ecosystem.

Materials and methods

Study model: the “claire” pond

This study was carried out in 1998 and in 1999 in ponds from Marennes-Oléron Bay located on the French south-west Atlantic coast.

Claire ponds are traditionally used in oyster culture in this bay. They communicate with the bay through channels, and exchange of water occurs for a few days at spring tide (open system). On the contrary, during neap tides, oyster ponds function as closed systems.

The claire ponds were previously chosen as a study model for the parasite *Marteilia refringens* life cycle studies because 1) the parasite was endemic and 2) the species richness was low (Berthe et al., 1998; Audemard et al., 2001).

It is important to notice that in 1998, the complete draining of the pond was performed once a month to sample benthic species to be analysed for *M. refringens* presence (Audemard et al., 2001). After this sampling the claire was refilled and the water was entirely renewed. The different situation of the claire (closed, open or emptied) are represented on the figure 1.

Dynamic of *Marteilia refringens* within *Ostrea edulis*

Parasitism intensity

In 1998, we determined *Marteilia refringens* intensity dynamic in two batches of flat oysters (one batch previously infected by exposure in the claire pond named H97 and one batch to be infected during this study named H98) as previously stated in Audemard et al. (2001).

Intensity of infection in each oyster was obtained by counting the number of parasites in five microscopic fields randomly chosen (magnification X 1000). Compared to the results presented in Audemard et al. (2001), analysis presented in this publication include data from February to November 1998 and not only from February to July.

Determination of the infection period of flat oysters

Determination of the infection period was performed from March 1999 to January 2000. Dual set of experiments were used, the first one in the claire (endemic zone) and the second one in the laboratory (non infected environment) during. Temperature was continuously recorded within the Claire in 1999 as well as within the tanks from the laboratory.

From March to September, independent batches of Marteilia-free oyster were successively held in the claire for one month, and then placed in Marteilia-free conditions in the laboratory in separate tank (one tank per month). An extra batch of 30 Marteilia-free flat oysters was held in the claire in mid October and analysed in January 2000 to attest of the impossibility to infect oysters during winter period.

Another batch of 30 Marteilia-free flat oysters was held in the claire from March to the end of the experiment as a positive control. A last batch of 30 Marteilia-free flat oysters was held in the laboratory to control the absence of contamination in laboratory based-rearing system.

In October, the first seven batches reared in the laboratory as well as the controls were checked for M. refringens presence by means of both digestive gland imprints and histological sections. The last batch exposed in the claire from October 99 to January 2000 was analysed in February.

Dynamic of *Marteilia refringens* within *Paracartia grani*

Search of M. refringens in pools of individuals of Paracartia grani was performed with PCR realised primers specific of M. refringens. Results concerns the year 1998 and the year 1999. Protocols were previously described in Le Roux et al. (1999).

Tissues of about 50 individuals of P. grani were suspended in 10 volumes of extraction buffer (NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, pH8, SDS 0.5%) containing proteinase K (100 µg/ml). Following an overnight incubation at 50°C, DNA was extracted using a standard protocol involving phenol/chloroform, and precipitation with ethanol. PCR was performed as described by Le Roux *et al.* (1999), with two different primer pairs: one pair CS1/CAS1, was common to 50 eukaryotic species examined including *Marteilia* (universal primers) providing

an internal control of amplification experiments. The other one, SS2/SAS1, was specific for *M. refringens* 18S rDNA (Berthe *et al.* 2000; Le Roux *et al.* 1999). PCR was performed in 50 μ l with 10ng of purified DNA mixed with 5 μ l of PCR buffer 10X, 5 μ l of 25 mM MgCl₂, 5 μ l of 2 mM of each dNTP, 0.5 μ l of each primer at 100 μ M and 0.25 μ l (1 unit) of Taq DNA polymerase (Promega). Samples were overlaid with mineral oil, denatured for 5 min at 94°C and amplified by 30 cycles: 1 min at 94°C for denaturation, 1 min at 55°C for primers annealing, and 1min at 72°C for elongation in a thermal cycler apparatus (Appligene). Polymerisation at 72°C was then extended for 10 min to ensure completion of the amplified products.

Zooplankton species richness and abundance in the claire

Species or group of species from this model have been previously documented in 1998 (see Audemard *et al.*, 2001). Quantitative sampling of the zooplankton was performed in 1998. Sampling was performed weekly by filtrating 400 litres of water from the claire through a 100 μ m mesh net. Animals collected on this mesh were preserved in absolute ethanol, then, species were identified and counted.

Results

Environmental parameters of the claire

Year 1998

Water temperatures ranged from 8°C in February to 25°C in summer (Fig. 2a). Salinity ranged from 28 in spring (April) to 37 in summer (August). Mean values were lower than 15°C until mid-April and higher than the 17°C threshold, convenient for the *Marteilia refringens* transmission to flat oyster according to Grizel (1985), from May to late September (see also Audemard *et al.*, 2001).

Year 1999

In the claire, temperature ranged from 8 to 10°C in March 1999 up to 29°C in the end of July (Fig. 2b). The 17°C threshold was reached at the end of March and only ended at the end of October 1999. Temperature lower than 3°C was only recorded in mid-November 1999.

During laboratory experiments, temperature higher than 17°C was recorded from mid May to late September. Thus, laboratory thermal conditions were not a limiting factor for the development of *Marteilia refringens* within oysters if they were previously infected during their one-month stay in the claire.

Dynamic of *Marteilia refringens* within *Ostrea edulis*

Parasitism intensity

Intensity of infection increased five-fold in batch 97 from 24th February to 29th April (Fig. 3). This could not be explained by a new infestation process as *Marteilia* free flat oysters of batch 98 remained uninfected until May 1998. Consequently, the increase of parasitism intensity in infected oysters (batch 97) could result from an internal multiplication of the parasite appeared to be linked to the spring increase temperature from 10 in March to at least 15°C in April. This result is consistent with the thermal threshold 12°C considered to allow internal multiplication stated by Grizel (1985).

The decrease of parasitism intensity in batch 97 between April and May and at the beginning of July, could be explained by both release of mature sporangia and death of the most infected oysters, as reported by Berthe *et al.* (1998).

Marteilia free flat oysters (H98) were found to be infected in mid-June in this pond. The increase of parasite intensity detected in both batches 97 and 98 is due to a combination of infestation and internal multiplication of the parasite occurring during the summer period. Compared to the study of Audemard *et al.* (2001) parasitism intensity was analysed till November. This demonstrated that all the oysters initially infected died after the 22nd of July 1998 as intensity of infection in batch 97 was 7 times higher than in February.

Free flat oysters were found to be infected in mid-June however, contamination of non infected oysters could have occurred earlier in spring although, due to the low infection level of oysters by *M. refringens* or inconspicuous location in host tissues, this contamination could not have been detected by histology. Consequently, it appeared necessary to determine the infection period of the oyster in the claire.

Determination of the period of infection of flat oysters within the claire

Imprints analyses of the 'positive control' of 30 *Marteilia*-free flat oysters held in the claire in March 1999 were performed in early October. Results indicated that all oysters were infected, demonstrating that transmission of *M. refringens* to *Marteilia*-free flat oysters was functional within the claire in 1999.

Similarly, imprints analyses of the 'negative control' placed in laboratory conditions in March was performed in early October. Results indicated that oysters were not infected by *Marteilia refringens*, demonstrating that the laboratory can be considered as an uninfected environment. Among the experimental batches, only three showed presence of *Marteilia refringens* infection (Table 1). It clearly appeared that the infection period spreads from early June to end of August. If a correlation between months of infection and thermal conditions within the claire is made (Table 1), it appears that positive results were obtained when more than 28 days/nights a month have experienced minimum temperature higher than 17°C. A similar conclusion appears with the 20°C threshold; positive results being consistent with figures of 12 days/nights a month which have experienced minimum temperature higher than 20°C.

When comparing thermal conditions in 1998 and in 1999, we noticed that the thermal threshold 17°C was attained in the claire from May to September in both years. The great similarities between thermal conditions in 1998 and in 1999 led us to postulate that the infection period determined in 1999 could be approximately the same in 1998, and should be limited to June, July and August.

Marteilia refringens dynamic in *Paracartia grani*

PCR performed with *Marteilia refringens* specific primers on 1998 samples, demonstrated the recurrent presence of *M. refringens* in *P. grani* (on the 20th, 28th of May, 27th of July, 12th and 26th of August). These data are indicated by stars on figure 3a.

In 1999, analysis of *P. grani* by PCR, demonstrated the presence of *M. refringens* DNA from the 14th of July to the 31st of August and from the 15th of September to the 29th of October 1999 (Table 1).

Zooplankton from the claire

Planctonic copepod comprised Paracartia grani, Acartia discaudata, Acartia clausi, Acartia bifilosa, Euterpina acutifrons, Temora longicornis, Centropages hamatus, Eurytemora pacifica and the group of the cyclopoid copepods.

Dynamic of total planctonic copepod

Abundance were null on 3 dates, on the 7th of May, 6th of August and 2nd of September (Fig. 3b). Maximum abundance were noticed on the 14th and 20th of May with respectively 6050 and 4900 individuals/m³, and a peak on the 13th of July (17 350 individuals/m³).

Dynamic of nauplii and copepodid of calanoid copepod

Nauplii of calanoid showed very high abundances (Fig. 3c) with maximum noticed on the 7th of May ($2.9 \cdot 10^6$ individuals/m³), 19th of June ($1.8 \cdot 10^6$ individuals/m³) and on the 6th of August ($3.3 \cdot 10^6$ individuals/m³).

Copepodids also showed 3 peak of abundance on the 20th of May (25 500 individuals/m³), the 13th of July (41 200 individuals/m³) and on the 18th of August (8 520 individuals/m³).

Dynamic of Acartidae species

The species Acartia clausi was introduced from oceanic waters during period of sampling in spring and early summer (Fig. 3d). Its abundance significantly decreased from April (855 individuals/m³ on the 7th of April, 200 individuals /m³ on the 28th of May) to July where no individuals were observed.

Acartia discaudata followed an opposite pattern of development and characterised summer conditions of the Marennes-Oléron Bay and thus warm water of the oyster pond. Highest abundance (250 individuals/m³) was observed on the 20th of July.

Acartia bifilosa was, as expected due to its estuarine distribution, sampled in autumn when other species are less dominant. Presence of A. bifilosa was noticed on the 22nd of October with 25 individuals/ m³.

Paracartia grani is the most abundant Acartidae species in the claire pond especially during the summer months (Fig. 3^e). On some occasions, it can represent more than 50% of the total planktonic copepods. Variations in abundances seemed to be partly disturbed by the water management of the experimental claire, for instance in early May and mid-September. This species appeared on the 31st of march and was present till the end of sampling period in November. Its population dynamic was marked by high peak of abundance in May and July.

Highest abundance were recorded on the 14 and 20th of May (respectively 5800 and 4900 individuals/m³) and on the 13th of July (11500 individuals/m³). On the 20th of May, 8th of June and 18th of August, *P. grani* was the only species recorded among the copepod from the zooplankton. This species seemed to be favoured by the claire pond environment and is not impeded when the system is closed.

Males and females of *P. grani* appeared on the 31st of March with respectively 5 and 8 individuals/m³ (Fig. 3f). After this date, absence of male was noticed till the 14th of May where abundance was 2300 individuals/m³ and 3575 for the females.

Males abundances were higher than females on the 8th of June (500 individuals/m³ against 200 for females), 12th of June (180 against 100), 7th of July (167 against 67), 13th of July (8750 against 2750), 29th of October (100 against 50) and on the 11th of November (29 against 10).

Dominance of females was only noticed on the 20th of May (2650 against 2250), 18th of August (4140 against 50), 24th of September (200 individuals/m³) and 22nd of October (25 individuals/m³) where males were absent.

Discussion

The claire pond is considered as a study model for *Marteilia refringens* life cycle as the transmission of the parasite to flat oysters is effective and as the biodiversity is reduced 10 times compared to non confined environment as Marennes-Oléron Bay (Berthe et al., 1998; de Montaudouin and Sauriau, 2000; Audemard et al., 2001).

The present study demonstrated that the first release of *Marteilia* sporangia matches the appearance of *Paracartia grani* planktonic stages. In the claire, release of sporangia was observed till the beginning of April as temperature were higher than 12°C (Audemard et al., 2001). This release could explain the decrease of parasitism intensity in batch 97 between April and May. The appearance of *P. grani* was noticed on the 31st of March as temperature were temporally comprised between 15 and 17°C. Presence of *P. grani* as planktonic stages is conditioned by temperature and during winter this species is present as benthic resting eggs. The spring increase temperature allow the hatching of resting eggs (Rodriguez, Guerrero and Bautista, 1995) and may explain the appearance of *P. grani* at the end of March in the claire.

When considering *Marteilia* sporangia release (April) and its crustacean host appearance in the water (April), it appears that these mechanisms may be synchronised as a result of temperature effects. Considering our observations, temperatures comprised between 12 and 17°C could be determinant in this mechanism and may favour the presence of sporangia and the copepod at the same moment and consequently favour *M. refringens* transmission from *O. edulis* to *P. grani*.

Infection period of *O. edulis* in the claire was limited to a three months period, June to August. These months can be characterised by temperature permanently above 17°C. We also demonstrated that the time of exposure required by oysters to be infected was less than a month. These results are in accordance with observations made by Grizel (1985) in a northern endemic zone along the French Atlantic coast (South Brittany).

During the infection period of flat oysters by *Marteilia refringens*, *Paracartia grani* could represent 100% of the copepods from the zooplankton. Abundances observed within this claire were among the highest values recorded in other environments. The highest abundance recorded in July with 11 500 individuals /m³ are comparable to the data observed in Arcachon Bay (1 000 to 10 000 individuals/m³) by Castel and Courties (1982), but this abundance is higher than what was observed in the Mundaka estuary (100 to 1 000 individuals/m³) by Villate (1981) and in Marennes-Oléron Bay (less than 100 individuals/m³) by Sautour (1991). Its faculty to attain high abundance within a short period (less than one month) that was delimited by the regular emptying of the pond, is linked to the high reproductive rate of this species.

Among the Acartidae copepods, *Paracartia grani* is the only species which appeared as particularly adapted to this environment and that may be considered as an autochthon species of the pond. In spite of the particular water management of the claire pond (open, closed or emptied) temporal succession of the *Acartia* complex (*Paracartia grani*, *Acartia clausi* and *Acartia discaudata* and *Acartia bifilosa*) follows the general trends previously described (Alcaraz, 1983; Castel and Courties, 1982; Villate, 1991; Collins and Williams, 1981; Sautour and Castel, 1993). *Acartia clausi*, is a neritic species that was only observed in spring and autumn as the claire is open and as the environmental parameters are not too selective (closed pond, summer period). The estuarine species *Acartia bifilosa*, observed in Marennes-Oléron in autumn (Sautour and Castel, 1993), entered the claire during this season but disappeared with the claire closing. *Acartia discaudata*, is considered as an “intermediate” species in between *P. grani* characteristic of unstable area and *A. clausi* characteristic of more stable

area (Alcaraz, 1983). This explains that *A. discadata* can be observed more frequently in the claire from spring to autumn as the claire is open. However its abundance never exceed 250 individuals/m³ which really low compared to 10 000 individuals/m³ that could be attained by *P. grani*.

Paracartia grani is known to be abundant in this type of confined ecosystems, conditioned by instability of both physical parameters (temperature and salinity) and biological conditions (quality and quantity of available food) (Guerrero and Rodriguez, 1998; Rodriguez and Jimenez, 1990; Rodriguez Guerrero and Bautista, 1995). This abundance can be seen as a positive factor for *M. refringens* transmission. Moreover the seasonal copepod abundance matches the seasonal *M. refringens* sporangia release by the infected oysters. High multiplication phase within the oyster (as seen with parasitism intensity in oysters) result in a high number of sporangia released in the environment during the summer period.

Mechanism of parasite transmission appears to rely on high parasite load by the oyster within the environment as the copepod host is abundant. Experimentally, it has been demonstrated that *P. grani* can be infected by *M. refringens* by exposure to sporangia released from infected oysters (Audemard et al., in press). Within the claire, the increase of parasite intensity detected in both batches 97 and 98 can induce a proportional number of released sporangia by the oysters. These stages may infect *P. grani* as demonstrated by the results showing that *M. refringens* can be detected in *P. grani* in May and August in 1998 and from mid July to end of August and in autumn after the 29 of September in 1999.

Based on the results of PCR performed on *P. grani* in 1999, the detection of the parasite in September and October does not match the infection period of the oysters. On the opposite, at the beginning of the infection period, in June, the parasite was not detected in *P. grani*. However, concerning this last data, the analysis of only one date in June is not sufficient to conclude on the presence or absence of *M. refringens* within *P. grani*. The detection of the parasite in *P. grani* after the infection period is more problematic. Thus, it appears that other factor may limit the infection of the oysters even if the parasite is present in its copepod host. Firstly, the development of the parasite within *P. grani* could be different from the development occurring during the summer period. With temperature decrease observed in autumn, *P. grani* produces benthic resting eggs (Guerrero and Rodriguez, 1998). This could influence or limit the development of *M. refringens* within the ovary of the copepod and induce an absence of production of the infective stage for the next host. Absence of infection in the oyster till September could also be explained by biological particularity of the oyster at

this time leading to a non susceptibility to the parasite. Finally, as the direct transmission of the parasite from the copepod to the oyster had not been demonstrated (Audemard et al., in press), the involvement of another host which, till September, could be absent in the claire or not susceptible to parasite infection can not be excluded.

Infection of the ovarian tissue of *P. grani* by *M. refringens* may have consequences on the population dynamic of the copepod as one of the consequence of this infection could be a castration of the infected female. However, limited prevalence of the parasite (25%) previously noted in the claire (Audemard et al., in press) and high abundance of *P. grani* documented in the present study may limit potential parasite impact on population dynamic of the copepod. The fact that in this study males generally predominated over the females has also been observed in Malaga harbor (Rodriguez and Jimenez, 1990) where *Marteilia* is supposed to be absent. Consequently, infection of female by *M. refringens* does not seem to have a clear effect on female abundance. It would be particularly interesting to investigate if this infection can influence *P. grani* eggs production and hatching.

Among nauplii and copepodid of calanoid sampled in the claire, one part of these stages could belong to the species *P. grani* and result from the resting egg hatching at the beginning of spring, and subitaneous egg hatching all along the study. Other species from the claire can also produce resting eggs however, the high abundance of *P. grani* and the fact that this species is particularly adapted to this environment could induce a highest abundance of this species among nauplii and copepodid stages. The first peak of nauplii (53 260 individuals/m³) was noticed on the 22nd of April as temperature was higher than 17°C which is close to the threshold of 18°C necessary for the hatching of *P. grani* resting egg hatching (Guerrero and Rodriguez, 1998). Moreover, this high number of nauplii could also result in subitaneous egg whose production has been demonstrated to be maximal at the spring end as temperature reach 18°C in Malaga harbor (Rodriguez, Guerrero and Bautista, 1995). At the end of May, high abundance of nauplii coincide with *P. grani* high abundances. These nauplii could result from the hatching of subitaneous eggs of this species which can occur 48h after being laid (Guerrero and Rodriguez, 1998). It appears however, difficult to demonstrate an influence of the parasite on the number of nauplii as 1) identification of the species was not performed and 2) in the claire, abundance was particularly high compared to other environments. Nauplii abundances were 40 times higher than the 50 000 individus/ m³ reported from the river of Morlaix (Brittany, France) by Paulmier (1969) and at least 10 times higher than the 150 000

individus/ m³ reported in Malaga harbor (South of Spain) where copepods were mostly composed by Acartidae species (Guerrero et Rodriguez, 1998).

Audemard *et al.* (in press) also demonstrated that copepodid stages of *P. grani* could be infected by *M. refringens*. As for the nauplii stages, copepodid stages are difficult to specifically identified and copepodid of *P. grani* were not particularly counted. However, it can be noticed that the number of copepodid only represents 1% of the number of nauplii. Natural mortality as well as predation could be responsible of this sharp decrease in abundance, but at this stage of the study, parasitism impact can not be excluded.

Conclusion

Within our study model, claire ponds of Marennes-Oléron Bay (S-W of France) we have demonstrated that the flat oyster infection by the parasite *Marteilia refringens*, matches the appearance and dominance among the zooplankton of its crustacean host, *Paracartia grani*. Increase spring temperature can be considered to be a main factor controlling and synchronising both the release of *M. refringens* sporangia and the hatching of benthic resting eggs of *P. grani* (Guerrero and Rodriguez, 1998).

Ecological study of *P. grani* in this endemic zone demonstrated that its seasonal abundance is particularly “adapted” to *M. refringens* seasonal life cycle. This high abundance of *P. grani* during *M. refringens* transmission and infection can be considered as a positive factor for parasite transmission as the encounter between the parasite and the copepod host may be facilitated.

Hypothetical impact of the parasite on *P. grani* population dynamic was not revealed during this study. However, considering our experimental design, establishment of population dynamic was limited and other studies including pond with *Marteilia* and pond without *Marteilia* presence may help in discriminating between natural effect and parasite impact on the population. Finally, in the case of castration induced by the parasite, the production decrease may be compensated by the high eggs production rate characterising this Acartidae species (Rodriguez, Guerrero and Bautista, 1995).

Finally, our observations of the dynamic of *M. refringens* in *O. edulis* and in *P. grani*, demonstrated that this parasite cycle could be involve other host, as it was hypothesised considering the absence of *M. refringens* transmission from the copepod to the oyster during previous transmission experiments (Audemard *et al.*, in press).

References

- Alcaraz, M., 1983. Coexistence and segregation of congeneric pelagic copepods, spatial distribution of the Acartia complex in the ria of Vigo (NW Spain). J. Plank. Res. 5, 891-900.
- Alderman, D. J., 1979. Epizootiology of Marteilia refringens in Europe. Mar. Fish. Rev. 41(1-2), 67-69.
- Audemard, C., Barnaud, A., Collins, C. M., Le Roux, F., Sauriau, P.-G., Coustau, C., Blachier, P., Berthe, F. C. J., 2001. Claire ponds as an experimental model for Marteilia refringens life-cycle studies: new perspectives. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 257, 87-108.
- Audemard, C., Le Roux, F., Barnaud, A., Collins, C. M., Sautour, B., Sauriau, P.-G., Montaudouin (de), X., Coustau, C., Combes, C., Berthe, F. Needle in a haystack: involvement of the copepod Paracartia grani in the life cycle of the oyster pathogen Marteilia refringens Parasitology sous presse.
- Balouet, G., Chastel, C., Cahour, A., Quillard, A., Poder, M., 1979. Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. Sci. Pêche, Bull. Inst. Pêches marit. 289, 13-22.
- Berthe, F. C. J., Le Roux, F., Peyrataillade, E., Peyret, P., Rodriguez, D., Gouy, M., Vivares, C. P., 2000. Phylogenetic analysis of the small unit ribosomal RNA of Marteilia refringens validates the existence of the phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990). J. Eukaryot. Microbiol. 47, 288-293.
- Berthe, F. C. J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, Ph., Thébault, A., Figueras, A.J., 1998. Experimental transmission of Marteilia refringens with special consideration of its life-cycle. Dis. Aquat. Org. 34, 135-144.
- Castel, J., Courties, C., 1982. Composition and differential distribution of zooplankton in Arcachon Bay. J. Plank. Res. 4, 417-433.

Collins, N. R., Williams, R., 1981. Zooplankton of the Bristol Channel and Severn Estuary. The distribution of four copepods in relation to salinity. *Mar. Biol.*, 64, 273-283.

Figueras, A. J. & Montes, J., 1988. Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *Am. Fish. Soc. Spec. Pub.* 18, 38-46.

Grizel, H., 1985. Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat d'Etat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.

Grizel, H., Comps, M., Bonami, J.R., Cousserans, F., Duthoit, J.L., Le Penec, M.A., 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Sci. Pêche. Bull. Inst. Pêches marit.* 240, 7-30.

Guerrero, F., Rodriguez, V., 1998. Existence and significance of *Acartia grani* resting eggs (Copepoda: Calanoida) in sediments of a coastal station in the Alboran Sea (SE Spain). *J. Plank. Res.* 20, 305-314.

Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A., Gouy, M., Berthe, F. C. J., 1999. Specific molecular probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mol. Biotech.* 1(6), 588-597.

Mialhe, E., Bachere, E., Boulo, V., Cadoret, J.P., Saraiva, J., Carrera, L., Rousseau, C., Cedeno, V., Calderon, J., Colwell, R.R., 1995. Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 4, 275-283.

Montaudouin (de), X., Sauriau, P. -G., 2000. Contribution to a synopsis of marine species richness in the 'Pertuis Charentais Sea' with new insight in soft-bottom macrofauna of the Marennes-Oléron Bay. *Cah. Biol. Mar.* 41, 181-222.

Paulmier, G., 1969. Le microplancton des rivières de Morlaix et de la Penzé. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 33, 311-332.

Reymond, H., 1991. Dynamique de la chaîne hétérotrophe benthique des marais maritimes en période estivale et son impact sur les productions aquacoles de carnivores: *Penaeus japonicus*, un modèle d'étude. Thèse Doctorat, Université Paris VI.

Rodriguez, V., Jimenez, F., 1990. Co-existence of congeneric species of *Acartia* (Copepoda Calanoida): sexual dimorphism and ecological niche in *Acartia grani*. J. Plank. Res. 12, 497-511.

Rodriguez, V., Guerrero, F., Bautista, B., 1995. Egg production of individual Copepods of *Acartia grani* Sars from coastal waters: seasonal and diel variability. J. Plank. Res. 17, 2233-2250.

Sautour, B., 1991. Populations zooplanctoniques dans le bassin de Marennes-Oléron; dynamique de population, nutrition et production des copépodes dominants. Thèse Doctorat, Université Bordeaux I.

Sautour, B.;Castel, J., 1993. Distribution of zooplankton populations in Marennes-Oleron Bay (France), structure and grazing impact of copepod communities. Oceanol. Acta 16, 279-290

Villate, F., 1991. Zooplankton assemblages in the shallow tidal estuary of Mundaka (Bay of Biscay). Cah. Biol. Mar. 32, 105-119.

Figures and table legends

Table 1: Results from digestive gland imprints performed on the trials of oysters placed in the claire during one month in 1998, with 1) the corresponding number of day/night with minimum temperature higher than 17°C and 20°C in the claire and 2) results of the PCR performed with specific primers of *M. refringens* on *P. grani*.

Figure 1: Schematic representation of variations of water level recorded in the claire pond (Open for open system, Closed for closed system and Emptied for emptied pond).

Figure 2: Environmental parameters of the claire pond in 1998 (a) and in 1999 (b). Day-to-day changes in temperature (minimum and maximum values), tidal range and water management (open / closed system to fresh marine water inputs) in the claire from the end of February to early November 1998 or the end of December in 1999.

Figure 3: (a) Dynamic of *Marteilia refringens* mean parasitism intensity within the 2 batch of flat oysters, (previously infected H97 and uninfected H98) with infection period. Detection of *M. refringens* by PCR on pools of *P. grani* are also indicated on the graph by stars, (b) abundance of total planktonic copepod, (c) abundance of nauplii and copepodid of calanoid, (d) Acartidae species, (e) abundance of *Paracartia grani* and (f) male and female *P. grani* abundances. On each of these graph, the infection period of oysters by *M. refringens* are delimited by a arrow.

Table 1: Determination of the infection period of flat oysters within the claire pond and detection of *M. refringens* in *P. grani* DNA extracts

Trial	Month within the Claire	Digestive gland imprints	Day/Night > 17°C	Day/Night > 20°C	Zooplankton sampling date	Detection of <i>M. refringens</i> in <i>P. grani</i> DNA extract
1	March 1999	negative	0	0	-	-
2	April 1999	negative	1	0	-	-
3	May 1999	negative	19	8	-	-
4	June 1999	positive	28	12	16/06/99	Negative
5	July 1999	positive	31	29	14/07/99	Positive
					30/07/99	Positive
6	August 1999	positive	31	28	05/08/99	Positive
					13/08/99	Positive
					17/08/99	Positive
					25/08/99	Positive
					31/08/99	Positive
7	September 1999	negative	24	8	07/09/99	Negative
					15/09/99	Negative
					23/09/99:	Positive
8	From Oct. 99 to Jan. 2000	negative	No data	No data	29/10/99	Positive

Figure 1: Schematic representation of the water level in the claire

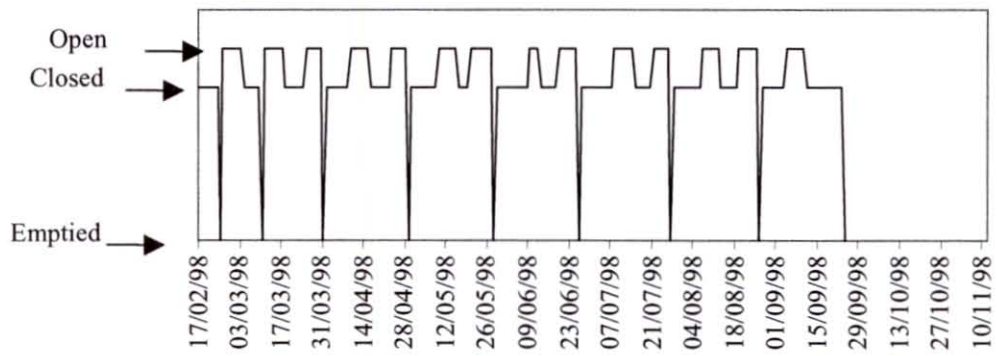


Figure 2: Environmental parameters of the claire pond in 1998 (a) and in 1999 (b)

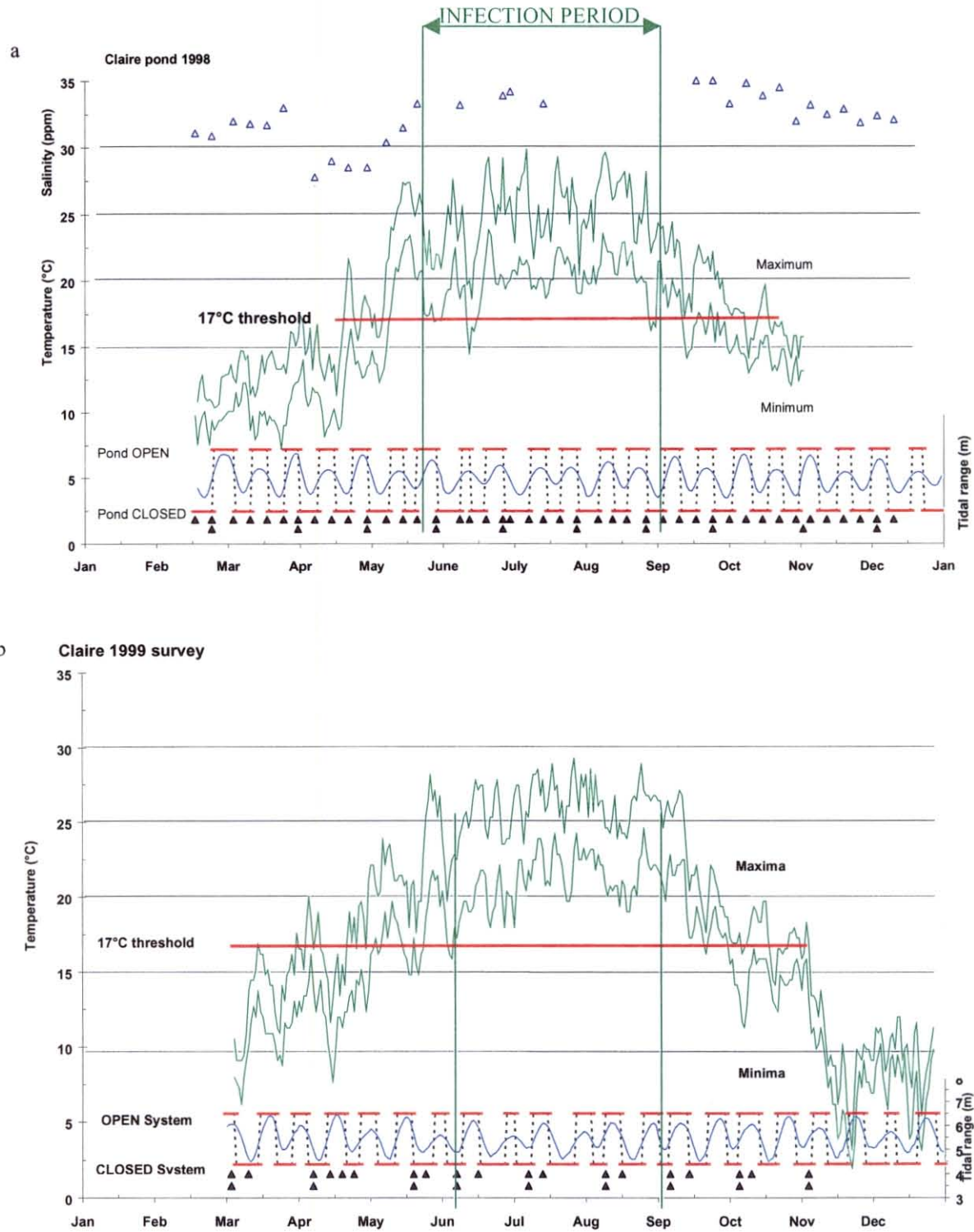
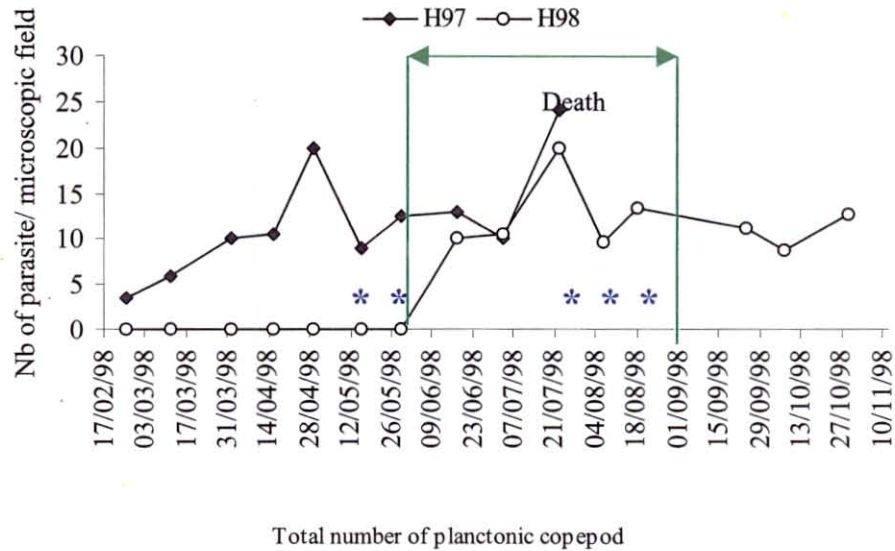
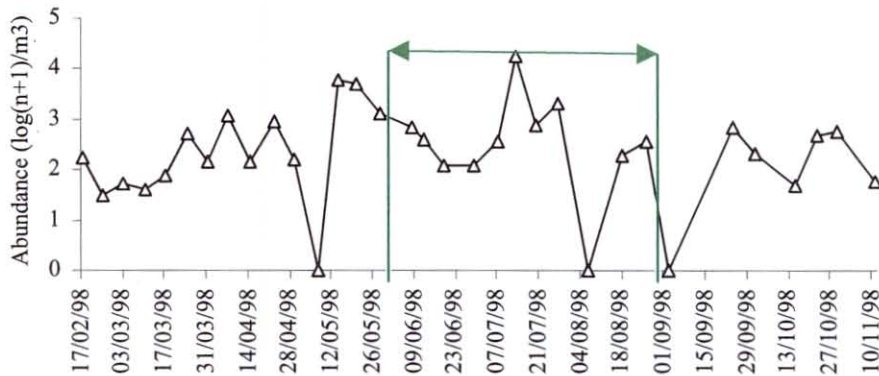


Figure 3: Dynamic of *Marteilia refringens* in oysters and dynamic of planktonic species in the claire pond.

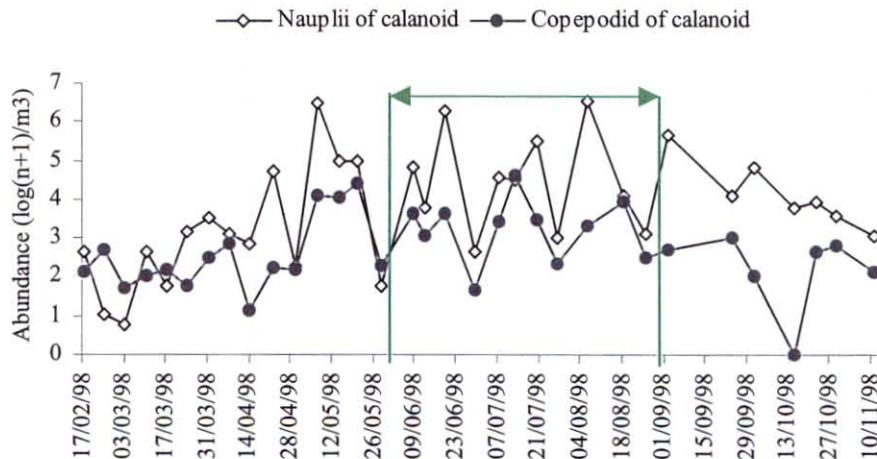
a



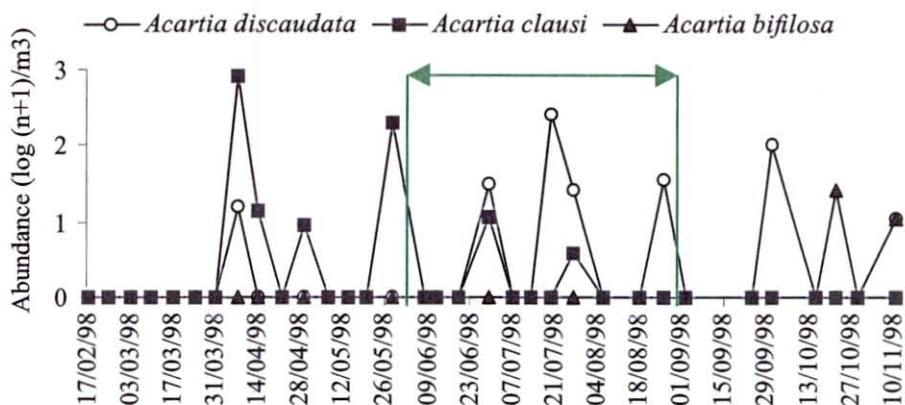
b



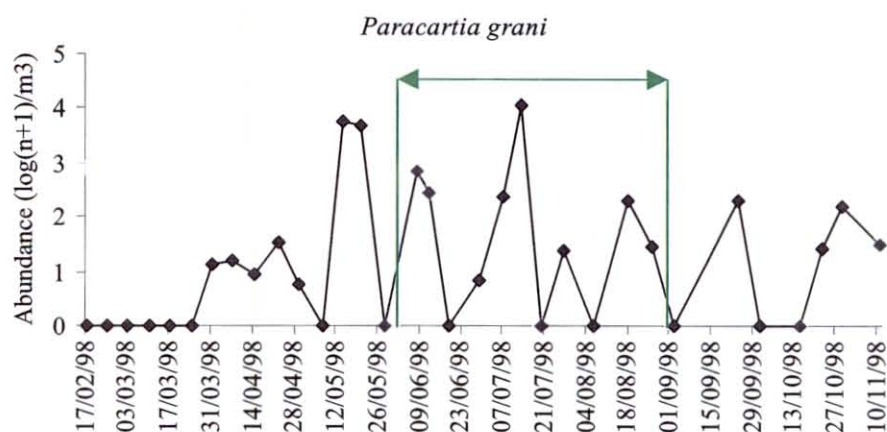
c



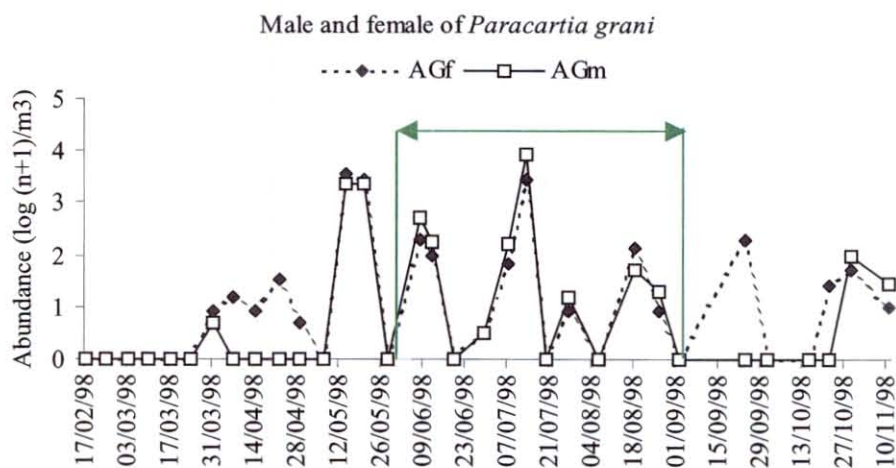
d



e



f



Sixième partie :

Discussion générale

I. Discussion des résultats obtenus

Les techniques de biologie moléculaire ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude des cycles parasitaires. L'utilisation conjointe de ces outils et d'un modèle d'étude de la marteiliose a permis d'apporter de nouveaux éléments de connaissance relatifs au cycle de vie de *Marteilia refringens*.

La PCR nous a permis d'analyser plus de 10 000 individus répartis parmi les 74 taxons échantillonnés en claire. Cette technique très sensible, rapide et spécifique, pose cependant certaines difficultés. Dans notre étude, elle n'a pu être appliquée à l'ensemble des espèces de la claire en raison de la présence de composés inhibant la réaction, de dégradation ou de trop faible quantité d'ADN. Pour ces espèces, le statut vis-à-vis de *Marteilia refringens* n'a pu être défini. Elles restent donc des candidats pouvant être impliqués dans le cycle de ce parasite.

L'hybridation *in situ* est une technique essentielle dans notre étude, car elle permet d'obtenir une information topographique. Cette technique a dû être adaptée aux espèces à étudier. Les tissus d'huîtres et les tissus de copépodes ne sont pas traités avec le même protocole. Les tissus de copépodes sont beaucoup plus fragiles, ils ont nécessité une plus faible perméabilisation des tissus, et un temps plus court d'hybridation par rapport aux tissus d'huîtres.

Grâce à cette technique, nous avons pu localiser *M. refringens* au sein du système ovarien des femelles adultes de *P. grani*. Cette spécificité du site d'infection est en accord avec le statut d'hôte impliquant une communication cellulaire pour la multiplication et la différenciation des cellules du parasite. La structure des ovocytes semble complètement bouleversée par la présence de nombreuses cellules de petites tailles (quelques micromètres). D'après ces observations, *M. refringens* pourrait se développer au sein des ovocytes. Par contre, *M. refringens* a aussi été détecté chez les copépodes par hybridation *in situ* mais des difficultés techniques ne nous permettent pas de définir avec précision le tissu infecté. Ces observations en microscopie photonique restent trop limitées pour décrire les stades de développement

(primaires à secondaires) du parasite et pour localiser de façon précise le tissu infecté notamment dans le cas des jeunes stades. De plus, la technique de microscopie photonique et en particulier la fixation des tissus de copépodes devrait être améliorée pour éviter les pertes de tissus observés sur les coupes.

La microscopie électronique est nécessaire à la description des stades de développement et des tissus infectés par *M. refringens* chez *P. grani*. Pour cela, un grand nombre d'individus infectés doit être obtenus à partir d'infections expérimentales pour obtenir de plus fortes prévalences que dans le milieu naturel.

Notre modèle d'étude présente l'avantage de comporter un nombre réduit d'espèces. Cependant, ce modèle est semi-ouvert, ses relations avec les chenaux et l'estran ne nous permettent pas de nous limiter aux espèces endémiques. Certaines espèces peuvent être présentes dans la claire au gré des renouvellements d'eau ou de leur cycle biologique. Par conséquent, la possibilité d'autres candidats hôtes du parasite ne peut être exclue.

La réduction de la biodiversité a permis d'isoler un segment fonctionnel du cycle de *M. refringens* mais ce résultat pourrait ne pas constituer une image exacte de la réalité dans une zone estuarienne. Dans un écosystème moins confiné comme le bassin de Marennes-Oléron, cette espèce pourrait jouer un rôle moins prépondérant dans le cycle de *M. refringens*. D'autres espèces de copépodes mieux représentés qu'en claire pourraient intervenir dans le cycle, augmentant ainsi le spectre d'hôtes pouvant être infectés. Dans ce contexte, une validation de ce résultat dans d'autres écosystèmes s'avère nécessaire.

Les essais de transmission expérimentale du parasite à partir de copépodes infectés ne nous ont pas permis d'infecter des huîtres. Cet échec peut être associé aux paramètres expérimentaux ou à une réalité biologique, l'implication d'autres espèces dans le cycle de *M. refringens* ou la nécessité d'une maturation du stade sortant du copépode avant d'être infestant.

Cependant, les données écologiques concernant *Marteilia refringens*, *Ostrea edulis* et *Paracartia grani* supportent l'hypothèse du rôle de ce copépode dans le cycle de *M. refringens*.

II. « Boucler son cycle est le leitmotiv de la vie des parasites » (Combes, 1995).

D'après les résultats de cette étude, *Marteilia refringens* a besoin d'au moins deux espèces, *Ostrea edulis* et *Paracartia grani* pour boucler son cycle. Dans chacune de ces espèces, une phase de multiplication intense est observée. Les cellules du parasite observées chez le copépode sont différentes des stades de développement observés chez l'huître et d'après ces observations, *P. grani* serait impliqué dans le cycle de vie de *M. refringens* en permettant le développement de stades particuliers. Ce parasite doit mettre en œuvre une stratégie lui permettant 1) de se développer chez chacun de ces hôtes et 2) de passer de l'un à l'autre.

L'exploration de cette stratégie se basera sur les éléments connus de *M. refringens* et de ses hôtes, acquis au cours de précédentes études, et, de notre propre travail. Nous prendrons en compte différents niveaux d'approche du cycle de vie de *M. refringens* : 1) la dynamique de ce parasite chez l'huître et le copépode, 2) le mode de transmission entre ces deux espèces puis, 3) les interactions pouvant exister entre *Marteilia*, ces hôtes et les facteurs environnementaux.

A. *Marteilia refringens* chez ces hôtes

1. *Ostrea edulis*

1.1. Schéma général

Chez *Ostrea edulis*, *Marteilia refringens* est observé essentiellement enchâssé entre les cellules épithéliales du tractus digestif. Chez l'huître, ce parasite se multiplie de façon intense avant d'être disséminé. Son développement est caractérisé par une série de divisions endogènes aboutissant à la formation de sporanges libérés dans l'environnement via les fèces de l'huître. Les premiers stades de développement sont fréquemment observés dans les palpes et l'estomac (Grizel, 1985 ; Barnaud, 2001). Les stades matures du parasite ne sont observés qu'au sein de la glande digestive, au niveau de l'épithélium des diverticules digestifs (Grizel *et al.*, 1974). Ce site d'infection est le lieu de la sporogénèse de *M. refringens*. Les réactions de l'huître en réponse à l'intrusion de *M. refringens* ne semblent pas engendrer de réactions

inflammatoires (Grizel *et al.*, 1974). *Marteilia refringens* évolue progressivement aux dépens de son hôte jusqu'à causer sa mort lors de la 2^{ème} année d'infection.

1.2. Atteinte du site d'infection

L'atteinte du site d'infection par *Marteilia refringens* chez les huîtres semble impliquer les voies trophiques. La filtration des huîtres, essentielle dans la nutrition, peut favoriser l'atteinte de cet hôte. Le faible taux de filtration des jeunes huîtres (naissain de moins de 6 mois) pourrait expliquer leur faible contamination (Balouet *et al.*, 1979). L'utilisation de la voie trophique est très probable car le parasite est observé dans les épithéliums des organes impliqués dans la nutrition. Le premier de ces organes est la branchie dans laquelle l'observation de jeunes stades de *M. refringens* reste rare (Comps, 1970), puis viennent les palpes, la bouche, l'estomac dans lesquels des stades jeunes sont fréquemment observés, et enfin, la glande digestive, site de la sporogénèse (Grizel *et al.*, 1974 ; Barnaud, 2001). Ces observations du parasite au sein des épithéliums permettent de tracer le parcours du parasite dans le tractus digestif de l'huître. Le parasite atteindrait la glande digestive avec le bol alimentaire.

1.3. Sporogénèse et phase de multiplication interne

Chez l'huître, le parasite présente une multiplication intense du printemps à l'automne ce qui lui permet de libérer dans l'environnement un nombre très important de sporanges. La sporogénèse aurait pour fonction d'assurer la dissémination du parasite dans l'environnement. Cette phase de développement est observée dans la glande digestive, organe impliqué dans les phénomènes d'absorption (Lubet, 1978) et constituant un site à haut potentiel énergétique. *Marteilia refringens* pourrait détourner une partie des nutriments directement en prélevant ces composés nutritifs au sein des diverticules ou indirectement via les cellules de l'hôte grâce au contact étroit qu'il établit avec les cellules épithéliales par l'intermédiaire de microvillosités (Grizel *et al.*, 1974).

Les importantes augmentations des intensités parasitaires observées en période printanière en l'absence de surinfection et en période estivale, ont permis de poser l'hypothèse d'une phase de multiplication interne du parasite. Pour Franc (1980) et Grizel (1985) des phénomènes de schizogonie ou/et de reproduction sexuée peuvent être à l'origine de cette multiplication. Néanmoins, Barnaud (2001) ne distingue qu'une phase de sporogénèse.

Le déterminisme d'un développement de type sporogonique ou de type « multiplication interne » peut être induit par les particularités de l'organe dans lequel le parasite se trouve. Par

interactions entre le parasite et les cellules épithéliales de la glande digestive, le développement induit est une sporogonie. Les palpes, la bouche et l'estomac constituent visiblement des sites inadaptés à cette phase de développement. Les caractéristiques phénotypiques de ces organes, différentes de celles de la glande digestive, peuvent être à l'origine de cette particularité. Ces organes peuvent néanmoins être impliqués dans une autre phase du cycle de vie de *M. refringens* telle que la phase de multiplication interne.

La mise en évidence d'un déterminisme de développement en fonction de l'épithélium infecté résultant du type d'interactions cellulaires entre *M. refringens* et les cellules épithéliales, constitue un modèle intéressant d'interaction hôte/pathogène au niveau cellulaire.

1.4. Libération du parasite dans l'environnement

Après rupture de la membrane du pansporoblaste, les sporanges sont libérés dans les diverticules puis dans l'environnement via les fèces de l'huître. Le devenir de ces sporanges et des spores qu'ils contiennent reste inconnu. D'après nos résultats, l'exposition de copépodes adultes et juvéniles sains à des sporanges permet l'observation d'une infection des copépodes en moins de 7 jours (cf Annexe 2 et 4^{ème} partie du manuscrit). La forme infestante pour le copépode peut être constituée par le sporange lui-même, par les spores qu'il contient ou par d'autres formes plus complexes. Il faut cependant noter que l'évolution au sein de l'environnement des sporanges vers d'autres stades de développement n'a jamais été observée (Grizel *et al.*, 1974 ; Roubal *et al.*, 1989), ce qui irait à l'encontre des deux dernières hypothèses.

2. *Paracartia grani*

2.1. Schéma général

Marteilia refringens est observé chez les adultes femelles et chez les copépodites (ou juvéniles) de *Paracartia grani*. Ce parasite infecte le système ovarien du copépode, du site germinal aux oviductes (Figure 16). Les observations du parasite chez les copépodites ne nous permettent pas d'identifier avec certitude le tissu infecté par *M. refringens* (Figure 17). Le tissu ovarien est en cours de développement chez les copépodites rendant sa localisation moins aisée que chez les adultes. De plus, il ne peut être exclu que d'autres tissus puissent aussi être infectés. *Marteilia refringens* pourrait infecter un tissu différent de la gonade chez les copépodites avant d'infecter la gonade chez les adultes.

Nous avons noté la présence de nombreuses petites cellules pouvant constituer une intensité parasitaire très importante lors d'infections de l'ensemble du système ovarien. D'après ces observations, *M. refringens* peut se développer de façon intracellulaire au sein des ovocytes et utiliser le fort potentiel énergétique de ces cellules pour se développer et se multiplier.

Les copépodes peuvent faire intervenir des systèmes de défense permettant de limiter l'infection par phagocytose des agents pathogènes (Michel, 1971). Dans le cas d'une localisation « intraovocytaire » du parasite, celui-ci échapperait à l'action de ce type de système de défense.

L'infestation par *Marteilia refringens* pourrait avoir lieu au stade adulte et copépodite indifféremment, ou seulement au stade copépodite. Cet aspect nécessite d'être précisé dans le cadre d'essais de transmission expérimentale du parasite.

Les copépodites présentent des taux d'infections plus faible que les adultes. Dans le cas où les deux stades peuvent être infestés, il est vraisemblable que ce taux d'infection puisse être proportionnel au stade de développement de la gonade. Dans la cas où la cible du parasite est le stade copépodite, les faibles intensités parasitaires observées chez ces stades juvéniles pourraient s'expliquer à la fois par la présence de la gonade en cours de développement et par une infestation récente. Au contraire chez les adultes, les forts taux d'infections peuvent résulter du développement parallèle de la gonade et du parasite.



Figure 16 : *Marteilia refringens* dans une femelle de *Paracartia grani* au stade adulte mis en évidence par hybridation *in situ* de la sonde Smart2. (X 200).



Figure 17 : *Marteilia refringens* dans un individu copépodite de *Paracartia grani* mis en évidence par hybridation *in situ* avec la sonde Smart2. Contre coloration Bismark Brown. (X 200).

2.2. Ségrégation des sexes

Dans notre étude, seules les femelles et les copépodites sont infectés par *Marteilia refringens* (Figure ?). Chez les femelles adultes, la gonade est l'organe cible du parasite. En ce qui concerne les copépodites, nous n'avons pu déterminer avec précision le tissu concerné mais nous avons noté que les intensités parasitaires semblent beaucoup plus faibles que chez les adultes (Figure 16 et 17). Dans l'hypothèse où le site d'infection chez les copépodites est aussi constitué par le système ovarien, les faibles intensités d'infection pourraient être liées au développement incomplet de la gonade. En effet, le développement de la gonade débute à partir du premier stade copépodite et elle reste incomplètement formée jusqu'au stade adulte. La présence du parasite chez les copépodites mâles pourrait être limitée de part le déterminisme des tissus malgré leur différenciation incomplète. Ce déterminisme pourrait permettre la ségrégation de *M. refringens* chez les individus femelles.

Par ailleurs, le sexe des copépodites parasités reste à étudier pour déterminer si les deux sexes peuvent être infectés à ce stade ou si seulement les futures femelles présentent une infection. L'absence d'infection chez les mâles adultes et chez les nauplii pourrait résulter respectivement, de l'absence du tissu gonadique femelle et de l'absence de gonade. De plus, il faut noter que les nauplii ne se nourrissent qu'à partir du troisième stade développement alors que leurs réserves lipidiques sont épuisées (Calbet et Alcarz, 1997). Par rapport aux adultes ou juvéniles, ceux-ci pourraient ne pas ingérer la forme infestante de *M. refringens* de part

leurs préférences alimentaires. Lors de cultures de copépodes en milieu expérimental, il a néanmoins pu être montré que l'augmentation des quantités d'algues phytoplanctoniques de taille comprise entre 6 et 7 μm favorisait la croissance des nauplii, ce qui suggère qu'ils peuvent se nourrir dans cette gamme de taille de particules (Calbet et Alcarz, 1997). Cette gamme de taille reste très proche de la taille des sporanges comprise entre 9 et 19 μm (Perkins, 1976), et l'ingestion des sporanges de *M. refringens* ne peut être complètement exclue.

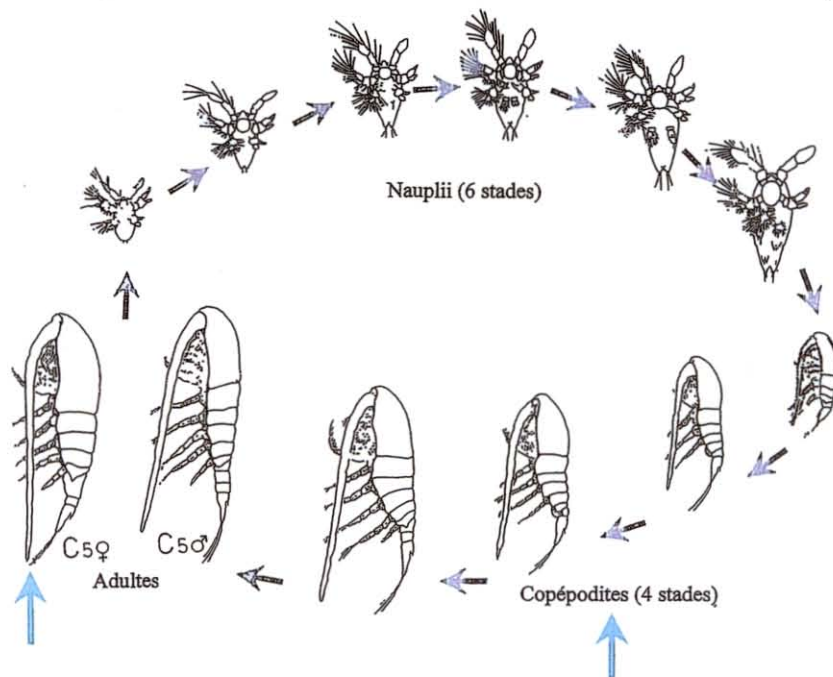


Figure 18: Stades de développement d'un copépode calanoïde et stades chez lesquels *Marteilia* a été mise en évidence (→).

2.3. Atteinte de l'organe cible

L'ingestion de la forme infestante (sporangies ou autres) par *Paracartia grani* pourrait constituer la première étape du cycle de développement de *Marteilia refringens* chez cet hôte. Le parasite peut atteindre le système ovarien au niveau de l'intestin moyen caractérisé par des zones de contact avec le site germinal de l'ovaire (Arnaud *et al.*, 1978 ; Arnaud *et al.*, 1980). Des processus plus complexes pourraient faire intervenir une action mécanique et enzymatique comme cela est observé pour des levures infectant la cavité générale de copépodes (Michel, 1971).

2.4. Sortie du site

Marteilia refringens pourrait être transmis à l'hôte aval par le biais de l'ingestion du copépode. Cependant, les intensités parasitaires et la localisation dans les ovocytes observées chez les femelles peuvent aussi suggérer l'existence d'une phase de dispersion dans l'environnement. Le parasite peut être libéré directement sous forme de stades libres ou par l'intermédiaire des œufs (fécondés ou pas). Nos observations mettant en évidence un bouleversement de la structure de l'ovocyte parasité (Figure 19), vont à l'encontre de la viabilité des œufs et de l'hypothèse d'une transmission verticale du parasite.

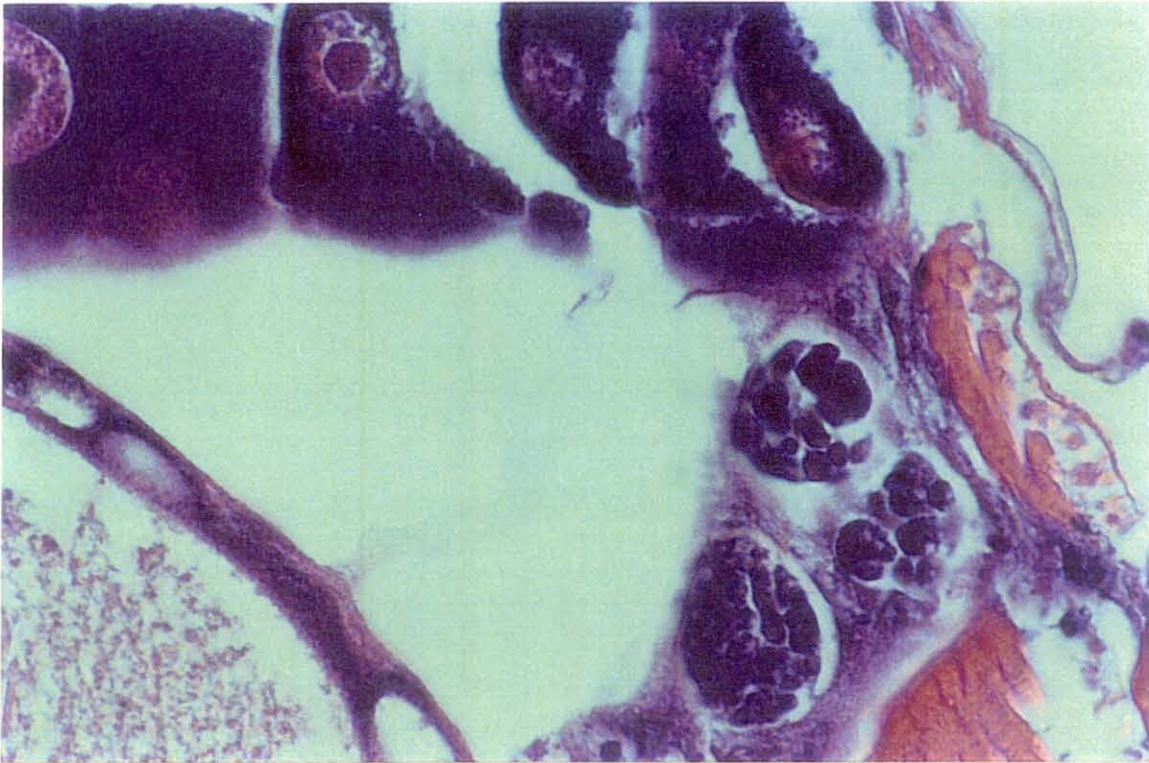


Figure 19 : Coupe transversale d'une femelle de *Paracartia grani* mettant en évidence des ovocytes non parasités (en haut) et parasités par *Marteilia refringens* (en bas). (Coloration hémalum éosine, X 1000)

B. Transmission d'un hôte à l'autre

Expérimentalement, nous avons pu montrer que la transmission de *Marteilia refringens* de *Ostrea edulis* à *Paracartia grani* nécessitait une durée de 7 jours au maximum. La transmission du parasite de *P. grani* vers *O. edulis* n'a pu être démontrée. De ce fait, cette

transmission pourrait faire intervenir d'autres espèces hôtes entre le copépode et l'huître (Figure 20).

Sur la base de nos observations, plusieurs hypothèses concernant les formes infestantes impliquées et le mode de transmission peuvent être posées.

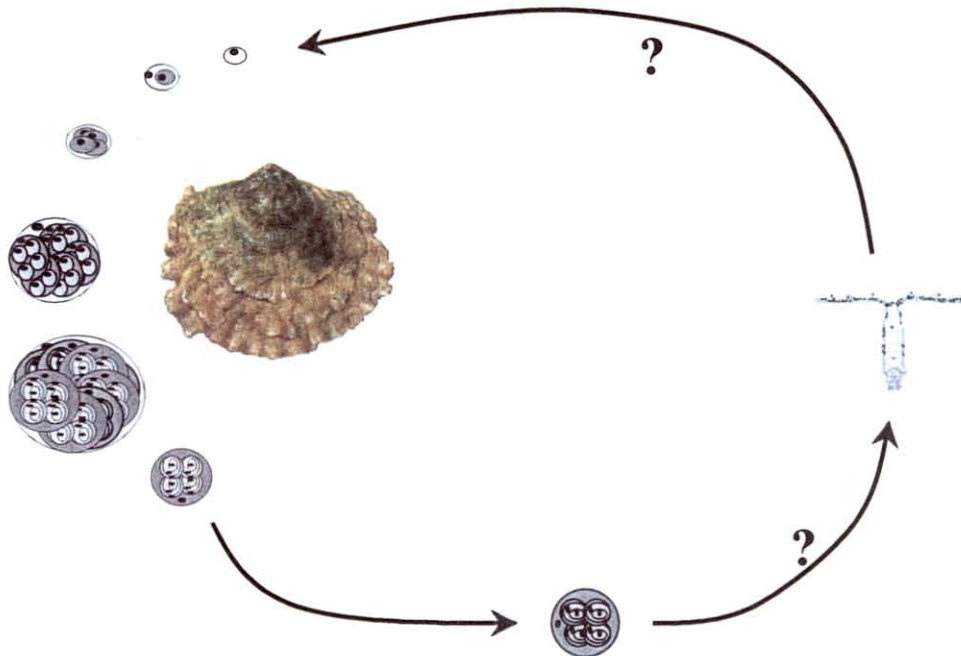


Figure 20 : Représentation schématique du cycle de vie de *Marteilia refringens*.

1. Transmission de l'huître vers le copépode

La propagule libérée via les fèces de l'huître correspond à un sporange contenant 4 spores. Cependant, la forme infestante pour le copépode pourrait se présenter 1) sous forme de sporanges, 2) sous forme de spores libérées à partir du sporange ou 3) sous forme de stades libres résultant de différenciation plus complexe à partir du sporange. Il faut cependant noter que l'évolution au sein de l'environnement des sporanges vers d'autres stades de développement n'a jamais été observée (Grizel *et al.*, 1974 ; Roubal *et al.*, 1989). En l'état actuel des connaissances, il semble que la première hypothèse soit la plus probable. Cependant, reste la question de la présence de 4 spores au sein de ce sporange et du devenir de celles-ci.

L'ingestion de *Marteilia refringens* par les copépodites et adultes de *Paracartia grani* est envisageable de part la gamme de taille des sporanges comprise entre 9 et 19 μm (Perkins, 1976). De plus, *P. grani* n'est pas strictement herbivore, l'ingestion de proies, d'œufs de

copépodes est connue. *Marteilia refringens* pourrait être ingéré au même titre que d'autres éléments organiques.

La rencontre entre les sporanges (ou autre forme) de *M. refringens* et *P. grani* peut être favorisée par les phénomènes de remise en suspension du sédiment et par conséquent des sporanges. Les écosystèmes où *M. refringens* est observé (estuaires, baies) sont de faible profondeur, ce qui pourrait favoriser l'impact de ces remises en suspension. Les femelles de *P. grani* peuvent de plus être présentes sur toute la colonne d'eau et seulement en surface (Rodriguez et Jimenez, 1990).

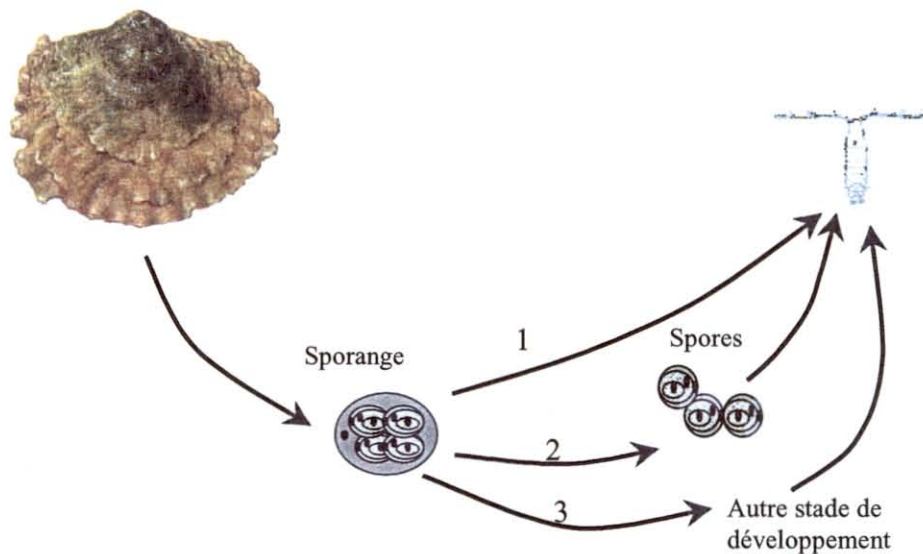


Figure 21 : Représentation schématique des différentes hypothèses relatives à la transmission de *Marteilia refringens* de *Ostrea edulis* à *Paracartia grani* et formes infestantes (1 : sporange, 2 : spores, 3 : autre forme).

2. Transmission du copépode vers l'huître

Sachant que l'ovaire de *Paracartia grani* constitue le site d'infection de *Marteilia refringens*, plusieurs modes de transmission peuvent être envisagés.

Le copépode parasité pourrait être directement ingéré par l'hôte aval (Figure 22, hypothèse 1). Cette hypothèse fait donc intervenir les relations prédateurs proies. L'huître peut ingérer de petits copépodes (Marteil, 1960) mais la taille des individus femelles de *Paracartia grani* (supérieure au millimètre) pourrait être une limite à ce type de transmission (Rodriguez et Jimenez, 1990).

Nos observations suggèrent une amplification du nombre de parasites dans l'ovaire (présence de nombreuses petites cellules de *M. refringens*). Cette multiplication pourrait favoriser une dispersion du parasite dans l'environnement. Cette dispersion pourrait impliquer des stades libres du parasite (Figure 22, hypothèse 2) disséminés après rupture des tissus du copépode, (mécanisme utilisé par des microsporidies parasites de copépodes (Michel, 1971)) ou via les voies naturelles. La localisation ovarienne du parasite peut faciliter une libération du parasite par l'orifice génital de son hôte.

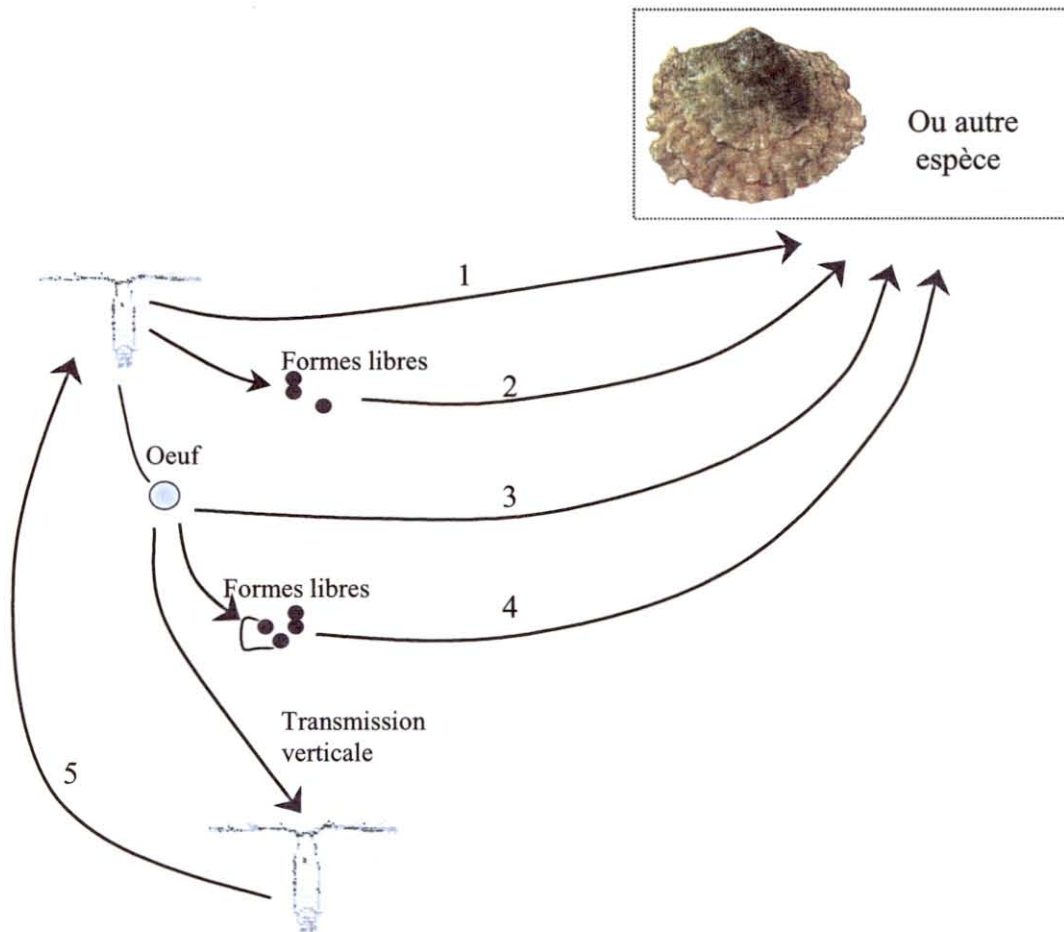


Figure 22: Représentation schématique des différentes hypothèses relatives à la transmission de *Marteilia refringens* de *Paracartia grani* à *Ostrea edulis* (1 : ingestion du copépode, 2 : formes libres, 3 à 5 : œuf parasité).

L'utilisation des voies naturelles peut aussi permettre une libération du parasite par le biais des œufs. Dans le cas où cet œuf n'est pas viable, la transmission à l'hôte aval peut se faire par ingestion de ces œufs (3^{ème} hypothèse). Dans ce cas, l'œuf constitue un vecteur du parasite, permettant une phase de dispersion supplémentaire. A partir de l'œuf pondu, le parasite peut

aussi être libéré dans l'environnement en amplifiant la phase de dispersion de *M. refringens* dans l'environnement (4^{ème} hypothèse).

La viabilité de l'œuf parasite peut impliquer une transmission verticale du parasite (5^{ème} hypothèse). D'après l'intense multiplication du parasite au sein de l'ovaire de *P. grani*, et la présence du parasite au sein de la totalité du système ovarien chez certains adultes, il semble que la transmission verticale soit peu probable. Enfin, il faut aussi noter que nous n'avons pas observé d'infection chez les stades nauplii de copépodes. Ces observations nous amènent à négliger l'hypothèse d'une transmission verticale par rapport aux autres.

Les hypothèses 3 à 5 font intervenir l'œuf du copépode dans la transmission du parasite. De ce point de vue, nous savons que *P. grani* peut pondre 2 types d'œufs, des œufs dont l'éclosion est très rapide et des œufs dits de durée pondus en automne avec la diminution de la température et la diminution de la photopériode (Guerrero et Rodriguez, 1998). Ces œufs peuvent subsister au sein du sédiment pendant l'hiver. Ils peuvent constituer un réservoir et une protection pour le parasite pendant l'hiver. Le parasite subsisterait alors pendant l'hiver au sein de 2 réservoirs, l'huître (sous forme de cellules primaires à secondaires) et les œufs de durée du copépode. La possibilité que de tels œufs donnent naissance à des nauplii semble peu probable. En effet, au laboratoire nos élevages de copépodes *P. grani* obtenus à partir d'œufs de durée prélevés dans la claire, ne présentaient pas de copépodes infectés.

Les modes de transmission de *M. refringens* du copépode vers l'hôte aval peuvent dépendre de l'hôte impliqué. Les copépodes constituent un maillon fondamental au sein de la chaîne alimentaire et l'ingestion de copépodes infectés par des prédateurs pourrait être un mode de transmission à envisager. Dans notre modèle d'étude, le cnidaire *Cereus pedunculatus* et le poisson *Pomatochistus microps* peuvent être des prédateurs de copépodes. L'ADN de *M. refringens* a été détecté chez ces espèces. Pour *C. pedunculatus* l'analyse par hybridation *in situ* n'a pas révélé la présence du parasite dans les tissus. Cependant, il ne peut être exclu que cette espèce soit impliquée dans le cycle de vie de *M. refringens* grâce à d'autres mécanismes extratissulaires (par exemple par action d'enzymes digestives).

Dans l'hypothèse d'une transmission directe du copépode vers l'huître, les différents vecteurs du parasite pourraient être l'eau (dans le cas où le parasite est libre dans l'environnement), l'œuf du copépode ou, de façon moins probable, le copépode lui même.

C. *Marteilia refringens* au sein de l'écosystème

Les données biologiques et écologiques caractérisant *Paracartia grani*, *Ostrea edulis* et *Marteilia refringens*, laissent supposer que ce parasite peut boucler son cycle sur la base de ces deux seuls hôtes. La stratégie du parasite ferait intervenir 2 hôtes complémentaires: 1) l'un sessile, l'autre planctonique, 2) l'un agissant en tant que réservoir, l'autre présentant des abondances très importantes lors de la période de transmission estivale et 3) les deux permettant au parasite de se multiplier de façon intense.

1. Echelle temporelle

Nous l'avons vu précédemment, *Marteilia refringens* a un cycle saisonnier qui se traduit chez l'huître par une phase de multiplication, libération et infection au cours de la période estivale puis par une phase de repos pendant l'hiver. *Paracartia grani* comme *M. refringens* a un cycle saisonnier très marqué. Ce copépode est présent sous sa forme planctonique alors que le parasite est libéré par l'huître dans l'environnement. L'abondance de *P. grani* pendant la période d'infection des huîtres peut favoriser la transmission de *M. refringens*. La transmission du parasite entre ces hôtes est régulée par le facteur température synchronisant à la fois la libération de *M. refringens* par les huîtres dans l'environnement et l'apparition de l'hôte aval, *P. grani*.

Pendant l'hiver, le copépode n'est plus présent sous sa forme planctonique mais seulement sous forme d'œufs de durée. De façon comparable, *M. refringens* est présent chez l'huître sous forme de jeunes stades ne se développant pas. L'huître peut être considérée comme un réservoir du parasite pendant l'hiver. La persistance du parasite au sein de l'huître d'une année sur l'autre est adaptée au cycle de vie de cette espèce pouvant vivre plusieurs années.

2. Echelle spatiale

Marteilia refringens est observé au sein des baies et des estuaires, ce qui correspond aux écosystèmes dans lesquels *Paracartia grani* est observé (Alcaraz, 1983; Rodriguez et Jimenez, 1990; Rodriguez, Guerrero et Bautista, 1995; Guerrero et Rodriguez, 1998).

Paracartia grani est présent au sein de l'aire de répartition de *M. refringens*. En Europe, la marteiliose est réparti du nord de la Bretagne aux côtes atlantiques espagnoles et en Méditerranée sur les côtes espagnoles, françaises, croates et grecques. *Paracartia grani* est

observé à proximité des parcs ostréicoles (Gallo, 1981) et dans les estuaires et les baies où la présence du parasite a été notée (Lubet, 1953 ; Paulmier, 1965 ; Paulmier, 1969 ; Alcaraz, 1983 ; Elbée (D') et Castel, 1995 ; Siokou-Frangou *et al.* 1997 ; Razouls et Bovée, 1999). La répartition géographique de *M. refringens* semble être essentiellement dépendante de la répartition de son hôte *P. grani* et dans une moindre mesure de celle de *Ostrea edulis* car sa répartition n'est pas restreinte aux zones confinées. Ces observations confirment l'implication de *P. grani* dans le cycle de vie de *M. refringens*.

Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'identifier des hôtes de *Marteilia refringens* afin de proposer une vision fonctionnelle du cycle de vie de ce parasite. L'application d'outils de biologie moléculaire sur une modèle d'étude à biodiversité réduite, nous a permis d'identifier un nouvel hôte de *M. refringens*, le copépode *Paracartia grani*. Cette espèce présente un cycle saisonnier et une répartition géographique en adéquation avec la répartition spatio-temporelle de la marteiliose ce qui pourrait suggérer que *M. refringens* puisse boucler son cycle de vie grâce à ce copépode et l'huître plate.

L'obtention de connaissances scientifiques et non plus seulement empirique des interactions entre *M. refringens*, ces hôtes et l'environnement peut ouvrir de nouvelles possibilités en termes de modélisation mathématique de ce cycle parasitaire. La modélisation nous permettrait de valider nos résultats dans différentes situations, et constituerait un outil de prédiction pour la gestion de la marteiliose au sein des zones endémiques.

Pour être validée, cette approche multiparamétrique nécessite la description et la quantification d'un maximum d'interactions entre *M. refringens*, ses hôtes et l'environnement. Néanmoins, beaucoup de zones d'ombre persistent après ce travail et posent des limites au développement d'outils de modélisation. Face aux échecs rencontrés lors des essais de transmission du parasite du copépode vers l'huître, l'implication d'autres espèces hôtes de *M. refringens* ne peut être exclue. Les stades de développement de *M. refringens* chez *P. grani* ainsi que les modes de transmission n'ont pu être précisément établis. D'autres techniques devront être utilisées pour répondre à cette question, en particulier la microscopie électronique. Par ailleurs, l'impact du parasite sur la dynamique de population de *P. grani* n'a pu être démontrée au sein de notre modèle d'étude.

D'un point de vue plus fondamental, *M. refringens* est un exemple de la complexité des interactions pouvant être mises en jeu dans un cycle parasitaire. Le développement chez *O. edulis* et *P. grani* est caractérisé par un tropisme marqué pour la glande digestive et le système ovarien respectivement. La transmission de l'un à l'autre de ces hôtes est contrôlée par la température du milieu ce qui se traduit par un cycle saisonnier observé à la fois pour *M. refringens* et l'hôte *P. grani* et vraisemblablement une « favorisation » de la transmission du parasite.

De plus, des questions d'ordre évolutif peuvent aussi se poser suite à la mise en évidence de deux espèces de *Marteilia* en Europe. Ainsi, sommes nous en présence d'une spéciation alloxénique ? autrement dit, sommes nous en présence d'une différenciation entre deux espèces, *M. refringens* et *M. maurini*, qui serait la conséquence de l'exploitation de deux hôtes (huître et moule) par «l'ancêtre» de ces parasites ?

Bibliographie générale

Adlard, R. D., Ernst, I. (1995). Extended range of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 15, 119-121.

Alcaraz, M. (1983). Coexistence and segregation of congeneric pelagic Copepods, spatial distribution of the *Acartia* complex in the ria of Vigo (NW Spain). *Journal of Plankton Research* 5, 891-900.

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

Amanieu, M. (1969) Recherches écologiques sur les faunes des plages abritées de la région d'Arcachon. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 19, 455-557.

Anderson, T.J., Adlard, R.D., Lester, R.J.G. (1995) Molecular diagnosis of *Marteilia sydneyi* (*Paramixea*) in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Angas). *Journal of Fish Diseases* 18, 507-510.

Anderson, T. J., Lester, R. J. G. (1992) Sporulation of *Marteilioides branchialis* n. sp. (*Paramyxea*) in the sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Angas). *Journal of Fish Diseases* 18, 507-510.

Andreadis, S, T. G. (1988) Comparative susceptibility of the copepod *Acanthocyclops vernalis* to a Microsporidian parasite, *Amblyospora connecticus*, from the mosquito *Aedes cantator*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52, 73-77.

Arnaud, J., Brunet, M., Mazza, J. (1978) Studies on the midgut of *Centropages typicus* (Copepod, Calanoid), I. Structural and ultrastructural data. *Cell Tissue Research* 187, 333-353.

Arnaud, J., Brunet, M., Mazza, J. (1980) Structure et ultrastructure de l'intestin chez plusieurs espèces de copépodes calanoides (Crsutacea). *Zoomorphologie* 95, 213-233.

Audemard, C., Barnaud, A., Collins, C. M., Le Roux, F., Sauriau, P.-G., Coustau, C., Blachier, P., Berthe, F. C. J. (2001) Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies : new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257, 87-108.

Audemard, C., Le Roux, F., Barnaud, A., Collins, C. M., Sautour, B., Sauriau, P.-G, de Montaudouin, X., Coustau, C, Combes, C., Berthe, F. Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens* *Parasitology* sous presse..

Auffret, M., Poder, M. (1983) Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne nord. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 47, 105-109.

Auffret, M., Poder, M. (1987) Pathology of the main bivalve mollusc species from oyster rearing areas in Brittany (France). *Aquaculture* 67, 255-257.

Bacher, C. (1991) Etude de l'impact du stock d'huîtres et des mollusques compétiteurs sur les performances de croissance de *Crassostrea gigas*, à l'aide d'un modèle de croissance. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 192, 41-47.

Bacher, C., Héral, M., Deslous-paoli, J.M., Razet, D. (1991) Modèle énergétique uniboite de la croissance des huîtres (*Crassostrea gigas*) dans le bassin de Marennes-Oléron. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences* 48, 391-404.

Balouet, G. (1979) *Marteilia refringens* - Considerations of the life cycle and development of Aber disease in *Ostrea edulis*. *Marine Fishery Review* 41, 64-66.

Balouet, G., Cahour, A., Chastel, C. (1979a). Epidémiologie de la maladie de la glande digestive de l'huître plate: hypothèse sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis* 8, 323-326.

Balouet, G., Chastel, C., Cahour, A., Quillard, A., Poder, M. (1979b) Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. *Bulletin de l'Institut des Pêches maritimes* 289, 13-23.

Barbault, R. (1997) Ecologie générale, structure et fonctionnement de la biosphère. Paris: Masson, 286 p.

Barnaud, A. (2001) Etude de la dynamique du parasite *Marteilia refringens* chez son hôte *Ostrea edulis*. Thèse Vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de Nantes, 118 p.

Barnes, R.S.K., Coughlan, J., Holmes, N.J. (1973) A preliminary survey of the macroscopic bottom fauna of the Solent, with particular reference to *Crepidula fornicata* and *Ostrea edulis*. *Proceeding of malacological society of London* 40, 253-275.

Berthe, F. C. J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, PH., Thébault, A., Figueras, A. J. (1998). Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life-cycle. *Diseases of Aquatic Organisms* 34, 135-144.

Berthe, F. C. J., Le Roux, F., Peyrataillade, E., Peyret, P., Rodriguez, D., Gouy, M., Vivares, C. P. (2000) Phylogenetic analysis of the small unit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of the phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47, 288-293.

Boulch-Bleas, D. (1983) A propos du régime alimentaire d'*Haminea hydatis* (Linné, 1758), (Mollusque, Opisthobranchie). *Haliotis* 13, 43-52.

Bodin, Ph. (1970) Copépodes harpacticoides marins des environs de la Rochelle, 1- Espèces de la vase intertidale de Chatellaillon. *Tethys* 2, 385-436.

Bodin, Ph. (1971) Copépodes harpacticoides marins des environs de la Rochelle, 3- Espèces de la zone intertidale de Fouras-nord. *Tethys* 3, 841-864.

- Bodin, Ph. (1974) Copépodes Harpacticoides marins des environs de la Rochelle. IV- Espèces de la zone intertidale des Nauteries. *Tethys* 4, 651-682.
- Bonami, J.-P., Grizel, H., Vago, C. (1971) Recherches sur une maladie épizootique de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35, 415-418.
- Bougrier, S., Tigé, G., Bachère, E., Grizel, H. (1986) *Ostrea angasi* acclimatation to French coasts. *Aquaculture* 58, 151-154.
- Bruslé, J., Cambrony, M. (1992) Les lagunes méditerranéennes: des nurseries favorables aux juvéniles de poissons euryhalins et/ou des pièges redoutables pour eux ? Analyse critique de la croissance des populations de Muges de plusieurs étangs saumâtres du Languedoc-Roussillon, au cours de leur première année de vie. *Vie Milieu* 42, 193-205.
- Burresson, E.M. (1997) Molecular evidence for an exotic pathogen: Pacific origin of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), a pathogen of Atlantic oysters. In: 10th International Congress of Protozoology, the University of Sydney, Australia, July 1997. Business meeting and Incentives. (Pascoe, M. ed.) Sydney: p 62.
- Cabioch, L., Gentil, F., Glaçon, R., Retière, C. (1977) Le macrobenthos des fonds meubles de la Manche : distribution générale et écologie. In: Biology of benthic organisms. 11th european Symposium on Marine Biology, Glaway, October 1976. (Keegan, B.F., Ceidigh, P.O., Boaden, P.J.S., eds.) New York, Pergamon Press: 115-128.
- Cahour, A. (1979) *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. *Marine Fishery Review* 41, 19-20.
- Calbet, A., Alcaraz, M. (1996) Growth and survival rates of early developmental stages of *Acartia grani* (Copepoda: Calanoida) in relation to food concentration and fluctuations in food supply. *Marine Ecology Progress Series* 147 181-186
- Carlton, J.T., Geller, J.B. (1993) Ecological roulette: the global transport of nonindigenous organisms. *Science* 261, 78-82.

Castel J. (1985) Importance des copépodes meiobenthiques lagunaires dans le régime alimentaire des formes juvéniles de poissons euryhalins. *Bulletin d'Ecologie (Paris)* 16, 169-176

Castel, J. (1986) Facteurs de distribution des peuplements de copépodes méiobenthiques dans des écosystèmes eutrophes littoraux (côte Atlantique). *Cahiers de Biologie Marine* 27, 441-455.

Castel, J. (1992) The meiofauna of coastal lagoon ecosystems and their importance in the food web. *Vie Milieu* 42, 125-135.

Castel, J., Courties, C. (1982) Composition and differential distribution of zooplankton in Arcachon Bay. *Journal of Plankton Research* 4, 417-433.

Castel, J., Dauvin, J.C., Glémarec, M. (1997) Les conditions générales en Atlantique, Manche et Mer du Nord. In: Les biocénoses marines et littorales françaises des côtes Atlantiques, Manche et Mer du Nord, synthèse, menaces et perspectives. (Dauvin, J.C., ed.) Paris, Musée National d'Histoire Naturelle: 6-16.

Castel, J.;Lasserre, P. (1977) Colonisation and spatial distribution of copepods in the semi-artificial lagoons In: Biology of benthic organisms. 11th European Symposium on Marine Biology, Galway, October 1976. (Keegan, B.F.;Ceidigh, P.O.;Boaden, P.J.S. eds.) New York, Pergamon Press: 129-146.

Ceschia, G., Mion, A., Orel, G. and Giorgetti, G. (1992) Indagine parassitologica delle mitillicolture del Friuli-Venezia Giulia (Nord-Est Italia). *Bolottin de la Societa Italiana. Patologia. Ittica* 9: 24-36.

Chatton, E. (1911) Sur une Cnidosporidie sans cnidoblaste (*Paramyxa paradoxa*, n.g., n.sp.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 152, 631-633.

- Chanley, P., Dinamani, P. (1980) Comparative descriptions of some oyster larvae from New Zealand and Chile, and a description of a new genus of oyster, *Tiostrea*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 14, 103-120.
- Cheng, T. C. (1983) The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoologist* 23, 129-144.
- Cheng, T. C. (1996) Hemocytes: forms and functions. In: *The Eastern Oyster : Crassostrea virginica, biology, culture and management of the Eastern Oyster* (V. S. Kennedy, R. Newell, A. F. Eble, eds) College Park: Maryland Sea Grant College: 183-218.
- Chipperfield, P. N. J. (1951) The breeding of *Crepidula fornicata* (L.) in the river Blackwater, Essex. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom* 30, 9-71.
- Chirwing, J.M. (1979) Isolation of biological active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Cigarria, J., Elston, R. (1997) Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis*, to Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 157-158.
- Collier, A. (1959) Some observations on the respiration of the American Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Publications of Institute of Marine Sciences, University of Texas* 6, 92-108.
- Collins, N. R., Williams, R. (1981) Zooplankton of the Bristol Channel and Severn Estuary. The distribution of four copepods in relation to salinity. *Marine Biology* 64, 273-283.
- Comps, M., Grizel, H. and Papayanni, Y. (1982) Infection parasitaire causée par *Marteilia maurini* sp. nov. chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. *Conseil International pour l'Exploitation de la Mer* C.M, F, 1-3.
- Comps M., Grizel H., Tigé G., Duthoit J.L. (1975) Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris Série D.* 281:179-181.

- Combes, C. (1995) *Interactions Durables. Ecologie et évolution du parasitisme*. Paris: Masson, Collection Ecologie, 26: 524 p.
- Comps, M. (1970) Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 34, 317-326.
- Comps, M. (1976) *Marteilia lengehi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 40, 347-349.
- Comps, M. (1979) Etude du cycle de *Marteilia refringens* dans l'étang de Thau. *Conseil International pour l'Exploitation de la Mer C.M, F*, 1-5.
- Comps, M. (1983) Etude morphologique de *Marteilia christensenii* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélécy-pode). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 47, 99-104.
- Comps, M. (1988) Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *American Fishery Society Special Publications* 18, 23-37.
- Comps, M., Duthoit, J.L. (1976) Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lamarck. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 283, 1595-1596.
- Comps, M., Grizel, H., Tigé, G., Duthoit, J. L. (1975) Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 281, 179-181.
- Comps, M., Park, M. S., Desportes, N. (1986) Etude ultrastructurale de *Marteilioides chungmuensis* n.g., n.sp. parasite des ovocytes de l'huître *Crassostrea gigas* Th. *Protistologica* 22, 279-285.

Comps, M., Pichot, Y., Papagianni, P. (1982) Recherche sur *Marteilia maurini* n. sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 45, 211-214.

Comps, M., Tigé, G., Grizel, H. (1980) Recherches ultrastructurales sur un Protiste parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*. L. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris Série D*, 290, 383-384.

Coste, M. (1861) Voyage d'exploration sur le littoral de la France et de l'Italie. Paris: Imprimerie impériale: 292 p.

Couch, C.A. (1989) Carbon and nitrogen stable isotopes of meiobenthos and their food resources. *Estuaries and Coastal Shelf Sciences* 28, 433-441.

Coum, A. (1979) La population de crépidules *Crepidula fornicata* (L. 1758) en rade de Brest: écologie et dynamique. Thèse de 3ème cycle de Bretagne Occidentale: 133 p.

Dauer, D. M., Maybury, C. A., Ewing, R. M. (1981) Feeding behavior and general ecology of several Spionid Polychaetes from the Chesapeake bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 54, 21-38.

Desportes, I. (1981) Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramyxa paradoxa* Chatton (Paramyxida). Parasite de l'annélide polychète *Poecilochaetus serpens*. *Protistologica* 17, 365-386.

Desportes, I., Ginsburger-Vogel, T. (1977) Affinités du genre *Marteilia*, parasite d'huîtres (maladie des Abers). et du crustacé *Orchestia gammarellus* (Pallas), avec les Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 292, 627-632.

Desportes, I., Lom, J. (1981) Affinités de *Paramyxa paradoxa* Chatton 1911, parasite de *Poecilochaetus serpens* (Annélide polychète) avec les *Marteiliidae* Sprague, parasites d'huîtres et du Crustacé *Orchestia gammarellus*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 292, 627-632.

Desportes, I., Perkins, F.O. (1990) Phylum Paramyxea. In Handbook of Protoctista. (Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., Chapman, D.J. eds.) Boston, Jones and Bartlett Publishing: 30-35.

Dussart, B. H., Defaye, D. (1995) Copepoda: an introduction to the Copepoda (Guides to the identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World. Amsterdam, SPB, Academic Publishing: 277 p.

Ekman, S. (1953) Zoogeography of the Sea. London, Sidgwick et Jackson: 417 p.

Elbée (D'), J., Castel, J. (1995) Evolution spatio-temporelle du zooplancton dans le bassin d'Arcachon: le rôle des variables de milieu. *Cahiers de Biologie Marine* 36, 33-45.

Elston, R.A. (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 259-276.

Elston, R.A. (1996) International trade in live molluscs: perspective from the Americas. In Prevention de la propagation des maladies des animaux aquatiques (B. Hill et T. Hastain, eds) *Revue des Sciences et Techniques de l'Office International des Epizooties* 15, 483-490.

Elston, R. A., Farley, C.A., Kent, M.L. (1986) Occurrence and significance of bonamiosis in european flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms* 2, 49-54.

Escaravage, V. (1987) Recherche d'indicateurs biologiques dans les réservoirs à poissons du bassin d'Arcachon en vue d'une caractérisation écologique. 1) Paramètres abiotiques et méiofaune. *Journal de la Recherche Océanographique* 18, 47-50.

Ferrari, I., Ceccherelli V.U., Mazzocchi M.G., 1982. Structure du zooplancton dans deux lagunes du delta du Pô. *Oceanologica Acta* N° SP: 293-302.

Ferraris, J. D., Palumbi, S. R. (1996) Molecular zoology: Advances, strategies and protocols. New York, John Wiley and Sons: 580 p.

Figueras, A. J., Jardon, C. F., Caldas, J. R. (1991) Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) : preliminary results. *Aquaculture* 99, 17-33.

Figueras, A. J. & Montes, J. (1988) Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *American Fishery Society Special Publications* 18, 38-46.

Figueras, A.J., Robledo, J.A.F. and Novoa, B. (1996). Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *Journal of Shellfish Research* 15, 363-368.

Fisher, W. S. (1986) Structure and functions of oyster hemocytes. In *Immunity in Invertebrates*. M. Brehélin, Berlin, Springer-Verlag: 25-35.

Franc, A. (1980) Sur quelques aspects inédits du cycle de *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974), parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Cahiers de Biologie Marine* 21, 99-106.

Fryer, S.E., Bayne, C.J. (1996) Host-Parasite interactions in Molluscs. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 15, 131-153.

Fuentes, J., Villalba, A., Zapata, C., Alvarez, G. (1995) Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Mytilicola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* 21, 221-226.

Gallo, J.-M. (1981) Les copépodes pélagiques de la Rochelle. *Annales de la Société des Sciences Naturelles de la Charente-Maritime* 6, 847-850.

Galtsoff, P. (1964) The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service* 64, 185-218.

Ginsburger-Vogel, T., Desportes, I. (1979) Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramarteilia orchestiae* gen. n. sp.n. parasite de l'amphipode *Orchestia gammarellus* Pallas. *Protistologica* 26, 390-403.

Ginsburger-Vogel, T., Desportes, I., Zerbib, C. (1976) Présence chez l'amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). d'un protiste parasite; ses affinités avec *Marteilia refringens* agent de l'épizootie de l'Huître plate. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 283, 939-942.

Glémarec, M. (1978) Distribution bathymétrique & latitudinale des bivalves du Golfe de Gascogne. *Haliotis* 9, 23-32.

Glémarec, M. (1979) Les fluctuations temporelles des peuplements benthiques liées aux fluctuations climatiques. *Oceanologica Acta* 2, 365-371.

Gouletquer, P., Héral, M. (1997) Marine Molluscan Production Trends in France: From Fisheries to Aquaculture. In The history, present condition, and future of the Molluscan fisheries of Nord America and Europe, volume 3. Europe. (Mackenzie C.L., Bunell, V.G., Rosenfield, A. eds.) NOAA Technical Report NMFS 129, Seattle, Washington, United States Departement of commerce: 137-164.

Grassé, P. (1960) Traité de Zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome 5, Paris, Masson: 2219 p.

Grelon, M. (1978) Saintonge, pays des huîtres vertes. Paris, éditions Rupella: 364 p.

Grizel H. 1985. *Etude des récentes épizooties de l'huître plate (Ostrea edulis Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne*. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 145 p.

Grizel, H. (1997) Les maladies des mollusques bivalves: Risques et prévention. *Revue des Sciences et Techniques de l'Office International des Epizooties* 16, 161-171.

Grizel, H., Comps, M., Bonami, J.R., Cousserans, F., Duthoit, J.L., Le Pennec, M.A. (1974) Recherche de l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis*, Linné. *Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes* 240, 7-30.

- Grizel, H., Comps, M., Raguénès, D., Leborgne, Y., Tigé, G., Martin, A. G. (1983) Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 46, 290-325.
- Grizel, H., Héral, M. (1991) Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, 47, 399-403.
- Grizel, H., Tigé, G. (1973) La maladie de la glande digestive d'*Ostrea edulis* Linné. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* C.M K 13, 1-7.
- Grizel, H., Tigé, G. (1977) Observations sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis* 8, 327-330.
- Grizel, H., Tigé, G. (1979) Observations sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis*, 8, 327-330.
- Gruet, Y., Prigent, D. (1986) Les buttes de Saint-Michel-en-L'Herm (Vendée): caractères de la population d'huitres (*Ostrea edulis* Linné) et de sa faune associée. *Haliotis* 15, 3-16.
- Guerrero, F., Rodriguez, V. (1998) Existence and significance of *Acartia grani* resting eggs (Copepoda: Calanoida) in sediments of a coastal station in the Alboran Sea (SE Spain). *Journal of Plankton Research* 20, 305-314.
- Héral, M. (1989) L'ostréiculture française traditionnelle. In *Aquaculture* (G. Barnabé ed.), Paris, Techniques et Documentation, Lavoisier: 345-389.
- Héral, M., Bacher, C., Deslous-Paoli, J. M. (1989) La capacité biotique des bassins ostréicoles. In *L'homme et les ressources halieutiques: essai sur l'usage d'une ressource commune renouvelable*. (Troadec, J. P. ed.) Ifremer, Brest, France: 225-259.
- Herrbach, B. (1971) Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35, 79-87.

- Hide, G. & Tait, A. (1991) The molecular epidemiology of parasites. *Experientia* 47, 128-140.
- His, E., Robert, R. (1980) Action d'un sel organo-métallique, l'acétate de tributyle-étain sur les oeufs et les larves D de *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Conseil International pour l'Exploration de la Mer C.M* 27, 1-10.
- Hubert, F., Van der Knaap, W., Noël, T., Roch, P. (1996) Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. *Aquatic Living Resources* 9, 115-124.
- Ianora, A.; Poulet, S.A.; Miralto, A. (1995) A comparative study of the inhibitory effect of diatoms on the reproductive biology of the copepod *Temora stylifera*. *Marine Biology* 121 533-539
- Jaziri, H. (1990) Variations génétiques et structuration biogéographique chez un bivalve marin: l'huître plate *Ostrea edulis* (L.). Thèse de doctorat. Université de Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc: 148 p.
- Jonasdottir, S.H., Fields, D., Pantoja, S. (1995) Copepod egg production in Long Island Sound, USA, as a function of the chemical composition of seston. *Marine Ecology Progress Series* 119, 87-98.
- Jorgensen, C. B. (1966) Biology of suspension feeding. Oxford, Pergamon press: 357 p.
- Jørgensen, G.B. (1990) Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology. Fredensborg, Olsen and Olsen: 140 p.
- Kinne, O. (1980) Diseases of marine animals: general aspects. In Diseases of marine animals. Volume I. General aspects, Protozoa to Gastropoda (Kinne, O., ed.) New York, J. Wiley and Sons: 13-73.
- Korringa, P. (1951) *Crepidula fornicata* as an oyster pest. *Conseil International pour l'Exploration de la Mer, Rapport des Procès Verbaux* 128, 55-59.

- Korringa, P. (1951) The shell of *Ostrea edulis* as a habitat. *Archives Néerlandaises de Zoologie* 10, 32-135.
- Korringa, P. (1976) Farming the cupped oysters of the genus *Crassostrea*. A multidisciplinary treatise. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 2, Amsterdam, Elsevier: 224 p.
- Koutsikopoulos, C., Beillois, P., Leroy, C., Taillefer, F. (1998) Temporal trends and spatial structures of the sea surface temperature in the Bay of Biscay. *Oceanologica Acta* 21, 335-344.
- Laabir, M., Poulet, S.A., Ianora, A., Miralto, A., Cueff, A. (1995) Reproductive response of *Calanus helgolandicus*. 2. In situ inhibition of embryonic development. *Marine Ecology Progress Series* 129, 97-105
- Labourg P.-J. (1976) Les réservoirs à poissons du bassin d'Arcachon et l'élevage extensif de poissons euryhalins (muges, anguilles, bars, daurades). *Pisciculture française* 45, 35-52.
- Lauckner, G. (1983) Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Diseases of marine animals. Vol. II. Introduction, Bivalvia to Scaphopoda. (Kinne, O., ed.) Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland: 477-961.
- Launey, S. (1998) Marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* L.: caractérisations à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique Paris Grignon, 214 p.
- Le Borgne, Y. (1996) Echanges internationaux des mollusques bivalves et situation actuelle en France et en Europe. In *Prevention de la propagation des maladies des animaux aquatiques* (B. Hill et T. Hastein, eds) *Revue des sciences et Techniques de l'Office International des Epizooties* 15, 491-498.
- Leibovitz, L., Elston, R. A., Lipovsky, V. P., Donaldson, J. (1978) A new disease of larval pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Sea Grant Reprint Series*, 603-615.

Le Roux, F.; Audemard, C.; Barnaud, A.; Gouy, M.; Berthe, F.C.J. (1999) Specific molecular probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1, 588-597.

Le Roux, F., Lorenzo, G., Peyret, P., Audemard, C., Figueras, A., Vivarès, C., Gouy, M., Berthe, F. (2001) Molecular Evidence for the Existence of Two Species of *Marteilia* in Europe. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 449-454.

Lester, R. J.G. (1986) Field and laboratory observations on the oyster parasite *Marteilia sydneyi*. In: Parasite lives: Papers on parasites, their hosts and their associations (Cremin, M., Dobson, C. and Moorhouse, D.E. eds.) St. Lucia, University of Queensland Press: 33-40.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honiberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F. G. (1980) A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* 27, 37-58.

Longshaw, M., Feist, S. W., Matthews, A., Figueras, A. (2001) Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxia) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Diseases of Aquatic Organisms* 44, 137-142.

Lubet, P. (1953) Variations saisonnières du zooplancton du bassin d'Arcachon. *Bulletin de la société zoologique de France* 78, 204-216.

Lubet, E. (1978) Nutrition des lamellibranches (huîtres, moules). *Océanis* 4, 23-54.

Lucic, D., Krsinic, F. (1998) Annual variability of mesozooplankton assemblages in Mali Ston Bay Southern Adriatic. *Periodicum Biologorum* 100, 43-52.

Marcogliese, D.J. (1996) Transmission of the sealworm, *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe), from invertebrates to fish in an enclosed brackish pond. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 205, 205-219.

Marcogliese, D. J., Cone, D. K. (1997) Food webs: a plea for parasites. *Tree* 12, 320-325.

- Maillard, C. (1976) Dismatoses de poissons en milieu lagunaire. Thèse de Sciences, Université Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier: 383 p
- Marques, J.C., Bellan-Santini, D. (1990) Faune d'amphipodes des milieux lagunaires du Portugal : actualisation des données et comparaison avec d'autres systèmes atlantiques et méditerranéens. *Mésogée* 50, 53-61.
- Marteil, L. (1960) Ecologie des huîtres du Morbihan *Ostrea edulis* Linné et *Gryphaea angulata* Lamarck. Thèse d'Etat. Université des sciences de Rennes: 120 p.
- Marteil, L. (1965) Extension de l'aire géographique de *Crepidula fornicata* L. pendant l'année 1964. *Sciences et Pêche Bulletin d'Information* 135, 5-6.
- Marteil, L. (1968) La maladie des branchies. *Conseil International pour l'Exploration de la Mer* C.M, K5, 3p.
- Marteil, L. (1976) La conchyliculture française, deuxième partie: biologie de l'huître et de la moule. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 207-312.
- Martin, A. G., Gérard, A., Cochenec, N., Langlade, A. (1993) Selecting flat oyster, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of resistance of a first selected generation. In Production, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture 92 (Special Publication of the European Aquaculture Society, Ghent Belgium, 18, 547-554).
- Meuriot, E., Grizel, H. (1985) Note sur l'impact économique des maladies de l'huître en Bretagne. *Rapport Techniques Institut Sciences et Techniques Pêches Maritimes*.
- Miahle, E., Bachere, E., Le Bec, C. and Grizel, H. (1985) Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 301, Serie III, no 4, 137-142.
- Mialhe, E., Bachère, E., Boulo, V., Cadoret, J. P., Saraiva, J., Carrera, L., Rousseau, C., Cedeno, V., Calderon, J., Colwell, R. R. (1995) Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* 4, 275-283.

Michel R. (1971) Champignons et protistes parasites de copepodes calanoides et cyclopoïdes de la région de Montpellier et d'Ales. Thèse 3ème cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier: 113 p.

Micieli, M.V., Garcia, J.J., Becnel, J.J. (2000) Horizontal transmission of *Amblyospora albifasciati* Garcia and Becnel, 1994 (Microsporidia : Amblyosporidae), to a copepod intermediate host and the neotropical mosquito, *Aedes albifasciatus* (Macquart, 1837). *Journal of Invertebrate Pathology* 75, 76-83.

Minchella, D.J., Scott, M.E. (1991) Parasitism: a cryptic determinant of animal community structure. *TREE* 6, 250-254.

Montaudouin (de), X., Sauriau, P-G. (2000) Contribution to a synopsis of marine species richness in the 'Pertuis Charentais Sea' with new insight in soft-bottom macrofauna of the Marennes-Oléron Bay. *Cahiers de Biologie Marine* 41, 181-222.

Moreau, J. (1968) Contribution aux recherches écologiques sur les claires à huîtres du bassin de Marennes-Oléron. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* 34, 380-462.

Newkirk, G.F., Haley, L.E. (1982) Progress in selection of growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology Progress Series* 10, 77-79.

Noël, P.Y., Tardy, E., d'Udekem d'Acoz, C. (1997) Will the crab *Hemigrapsus penicillatus* invade the coasts of Europe? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 320, 741-745.

O'Riordan, R.M., Ramsay, N.F. (1999) The current distribution and abundance of the Australasian barnacle *Elminius modestus* in Portugal. *Journal of Marine Biological Association U. K.* 79, 937-939.

Paulmier, G. (1965) Le microplancton de la rivière d'Auray. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* 29, 211-223.

Paulmier, G. (1969) Le microplancton des rivières de Morlaix et de la Penzé. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* 33, 311-332.

Perkins, F. O. (1976) Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens* - Taxonomic implications. *Journal of Protozoology* 23, 64-74.

Perkins, F. O. (1988) Parasite morphology, strategy and evolution. Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. *American Fisheries Society Special Publication* 18, 93-111.

Perkins, F. O., Wolf, P. H. (1976) Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. – Haplosporidian pathogen of Australian oysters. *Journal of Parasitology* 62, 528-538.

Peyretailade, E., Biderre, C., Peyret, P., Diffieux, F., Méténier, G., Gouy, M., Michot, B., Vivares, C. P. (1998) Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Research* 26, 3513-3520.

Pichot, Y., Comps, M., Tigé, G., Grizel, H., Rabouin, M. A. (1980) Recherche sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Sciences et Techniques des Pêches Maritimes* 43, 131-140.

Quéro, J.-C., Dardignac, J., Vayne J.-J. (1989) Les poissons du Golfe de Gascogne. IFREMER, Brest, France: 229 p.

Quéro, J.-C., Du Buit, M.-H., Vayne J.-J. (1998) Les observations de poissons tropicaux et le réchauffement des eaux dans l'Atlantique européen. *Oceanologica Acta* 21, 345-351.

Raimbault R. (1966) L'alimentation des mollusques planctonophages. *Revue des Travaux de l'Institut des Sciences et Techniques des Pêches Maritimes* 30 112-163

Raillard, O., Ménesguen, A. (1994). An ecosystem box model for estimating the carrying capacity of a macrotidal shellfish system. *Marine Ecology Progress Series* 115, 117-130.

- Ravail, B., Héral, M., Maestrini, S., Robert, J.M. (1988) Incidence du débit de la Charente sur la capacité biotique du bassin ostréicole de Marennes-Oléron. *Journal de la Recherche Océanographique* 13, 48-52.
- Ranson, G. (1943) Note sur la classification des ostréidés. *Bulletin de la Société de Géologie de France*, Ser. 5, 12, 161-164.
- Ranson, G. (1948) Ecologie et répartition géographique des Ostréidés vivants. *Revue des Sciences* 86, 469-473.
- Ranson, G. (1967) Les espèces d'huîtres vivant actuellement dans le monde définies par les coquilles larvaires ou prodissoconques. Etude de quelques uns des grands musées d'Histoire Naturelle. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 31, 127-199.
- Razouls, C., Durand, J. (1991) Inventaire des copépodes planctoniques méditerranéens. *Vie Milieu* 41, 73-77.
- Razouls, C., De Bovée, F. (1999) Diversité et répartition géographique chez les Copépodes planctoniques marins. <http://www.obs-anyuls.fr/Copepodes/RAZOULS1.htm>
- Renault, T. (1996) Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties* 15, 551-561.
- Renault, T., Cochenne, N., Chollet, B. (1995) Marteiliosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 161-164.
- Reymond, H. (1991) Dynamique de la chaîne hétérotrophe benthique des marais maritimes en période estivale et son impact sur les productions aquacoles de carnivores: *Penaeus japonicus*, un modèle d'étude. Thèse Doctorat, Université Paris VI: 257 p.
- Riera, V., Santmarti, M., Durfort, M. (1993) Presence of *Marteilia refringens*, in the cultures of bivalve molluscs in the Catalan littoral. Proceedings of the 14th national Congress on

Aquaculture, Illa de Arousa, 23-24 sept. Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura Cervino A and Landen A. eds) Vilagaracia de Arousa, Centro de Investigaciones Marinas: 804 p.

Robert, R., Borel, M., Pichot, Y., Trut, G. (1991) Growth and mortality of the european osyter *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resource* 4, 265-274.

Robledo, J.A.F., Caceres-Martinez, J., Figueras, A. (1994) *Marteilia refringens* in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) beds in Spain. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 14, 61-63.

Robledo, J. A. F., Figueras, A. J. (1995) The effects of culture-site, depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from Galicia, Spain. *Journal of Parasitology* 81, 354-363.

Robledo, J.A.F., Mialhe, E. and Figueras, A.J. (1995) Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa : *Ascetospora*) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). In: Techniques in Fish Immunology- Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates (4). (J.S. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. et al., eds) Fair Haven, SOS Publications: 117-121.

Roch, P., Hubert, F., Van der Knaap, W., Noël, T. (1996) Present knowledge on the molecular basis of cytotoxicity, antibacterial activity and stress response in marine bivalves. *Italian Journal of Zoology* 63, 311-316.

Roche, G. (1897) *La culture des mers*. Piscifactory, pisciculture, ostréiculture. Paris, Félix Alcan: 162-312.

Rodriguez, V., Guerrero, F., Bautista, B. (1995) Egg production of individual Copepods of *Acartia grani* Sars from coastal waters : seasonal and diel variability. *Journal of Plankton Research* 17, 2233-2250.

- Rodriguez, V., Jimenez, F. (1990) Co-existence of congeneric species of *Acartia* (Copepoda Calanoida): sexual dimorphism and ecological niche in *Acartia grani*. *Journal of Plankton Research* 12, 497-511.
- Roubal, F. R., Masel, J., Lester, R. J. G. (1989) Studies on *Marteilia sydneyi*, agent of QX disease in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 40, 155-167.
- Saavedra, C., Zapata, C., Alvarez, G. (1995) Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* 122, 95-104.
- Sauriau, P.-G. (1991) Spread of *Cyclope neritea* (Mollusca: gastropoda) along the north-eastern Atlantic coasts in relation to oyster culture and to climatic fluctuations. *Marine Biology* 109, 299-309.
- Sautour, B. (1991) Populations zooplanctoniques dans le bassin de Marennes-Oléron; dynamique de population, nutrition et production des copépodes dominants. Thèse Doctorat, Université Bordeaux I.
- Sautour, B.;Castel, J. (1993) Distribution of zooplankton populations in Marennes-Oleron Bay (France), structure and grazing impact of copepod communities. *Oceanologica Acta* 16, 279-290
- Schram, F. R. (1986). *Crustacea*. New York, Oxford University Press: 606 p.
- Siokou-Frangou, I., Papathanassiou, E., Lepretre, A., Frontier, S. (1997) Zooplankton assemblages and influence of environmental parameters on them in a Mediterranean coastal area. *Journal of Plankton Research* 20, 847-870.
- Singh, B. (1997) Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Inter. Journal of Parasitology* 27, 1135-1145.
- Sogin, M.L. and Gunderson, J. H. (1987) Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs: evolutionary implications. *Endocytobiology* 503, 125-139.

- Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D., Gouletquer, Ph. (1998) Hydrobiology of the Marennes-Oléron bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. *Hydrobiologia* 386, 131-146.
- Solic, M., Krstulovic, N., Marasovic, I., Baranovic, A., Pucher-Petkovic, T., Vucetic, T. (1997) Analysis of time series of planktonic communities in the Adriatic Sea : distinguishing between natural and man induced changes. *Oceanologica Acta* 20, 131-143.
- Sprague, V. (1979) Classification of the Haplosporidia. *Marine Fisheries Review* 41, 40-44.
- Stiller, J. W., Hall, B. D. (1999) Long branch attraction and the rDNA model of eukaryotic evolution. *Molecular Biology and Evolution* 16, 1270-1279.
- Thimel, A., Labourg, P. J. (1987) Recherche d'indicateurs biologiques dans les réservoirs à poissons du bassin d'Arcachon en vue d'une caractérisation écologique. 2) Macrofaune. *Journal de la Recherche Océanographique* 12, 51-54.
- Thomas, F., Cezilly, F., De Meeus, T., Crivelli, A., Renaud, F. (1997) Parasitism and ecology of wetlands: a review. *Estuaries* 20, 646-654.
- Tigé, G., Grizel, H., Martin, A. G., Langlade, A., Rabouin, M. A. (1981) Situation épidémiologique consécutive à la présence du parasite *Bonamia ostreae* en Bretagne. Evolution au cours de l'année 1980. *Science et Pêche, Bulletin de l'Institut des Pêches maritimes* 45, 283-318.
- Tigé, G., Rabouin, M. A. (1976) Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huître plate. *Conseil International pour l'Exploration de la Mer* C.M; K21, 1-10.
- Toro, J.E. (1995) A bibliography of Literature on the Chilean oyster *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845). *Journal of Shellfish Research* 14, 93-96.
- Trochon, P. (1976) Taxonomie et anatomie des huîtres. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 40, 161-179.

- Van Banning, P. (1979) Haplosporidian diseases of imported oysters *Ostrea edulis*, in Dutch Estuaries. *Marine Fishery Review* 41, 8-18.
- Vannier, J., Abe, K., Ikuta, K. (1998) Feeding in myodocopid ostracods: functional morphology and laboratory observations from videos. *Marine Biology* 132, 391-408.
- Van Praët, M. (1985) Nutrition of Sea Anemones. *Advances in Marine Biology* 22, 65-99.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Lopez, M. C., Carballal, M. J., Azevedo, C. (1993) Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW. Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Diseases of Aquatic Organisms* 16, 61-72.
- Villate, F. (1991) Zooplankton assemblages in the shallow tidal estuary of Mundaka (Bay of Biscay). *Cahiers de Biologie Marine* 32, 105-119.
- Walne, P. R. (1956) The biology and distribution of the Slipper Limpet *Crepidula fornicata* in Essex rivers with notes on the distribution of the larger epi-benthic invertebrates. *Fishery Investigations London* 2, 1-50;
- Wesche, S.J.;Adlard, R.D.;Lester, R.J.G. (1999) Survival of spores of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi* (Protozoa, Paramyxia) as assessed using fluorogenic dyes *Diseases of Aquatic Organisms* 36, 221-226
- Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.-L., Hureau, J.-C., et al. (1986) Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. Vol. III, Paris, Unesco.
- Wilson, I. G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology* 63, 3741-3751.
- Wolf, P.H. (1972) Occurrence of a Haplosporidan in sydney Rock Oysters (*Crassostrea commercialis*) from Moreton Bay, Queensland, Australia. *Journal of Invertebrate Pathology* 19, 416-417.

Annexe 1 :

Mise en évidence de deux espèces de *Marteilia* en Europe

J. Eukaryot. Microbo. 48(4), 2001 ; 449-454

Molecular Evidence for the Existence of Two Species of *Marteilia* in Europe

Frédérique LE ROUX, Gema LORENZO, Pierre PEYRET, Corinne AUDEMARD, Antonio FIGUERAS, Christian VIVARES, Manolo GOUY & Franck BERTHE

Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, 17390 La Tremblade, France
Insituto Investigaciones Marinas, CSI, Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, Spain and
Laboratoire de Protistologie moléculaire et cellulaire des parasites opportunistes, LBCP, UPRESA CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, France and
Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard-Lyon, 69622 Villeurbanne, France

Abstract

Marteilia refringens is one of the most significant pathogens of bivalve molluscs. Previous sequencing of the small subunit ribosomal RNA gene of *M. refringens* isolates derived from the infected mussels (*Mytilus edulis* and *Mytilus galloprolincialis*) and the oyster (*Ostrea edulis*) in Europe did not reveal genetic polymorphisms despite indications from epizootiological data that distinct types may exist. We investigated the existence of polymorphisms in the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes. The sequences of this region proved to be clearly dimorphic among *Marteilia* from five sampling sites. The distribution of the two genetic types, named "O" and "M", appeared to be linked to the host species, oysters and mussels, respectively. We therefore support the recognition of two species of *Marteilia* in Europe and propose that the "O" type corresponds to *M. refringens* and the "M" type to *M. maurini*.

Key Words. Dimorphism, genetic differentiation, host/parasite relationships, internal transcribed spacer.

Annexe 2 :
Nouveaux essais de transmission expérimentale
de *Marteilia refringens*
de l'huître plate *Ostrea edulis* vers le copépode *Paracartia grani*.

I. Contexte et objectif

A. Contexte

Les essais de transmission du parasite du copépode vers l'huître ne nous ont jamais permis d'infecter les huîtres. Cet échec peut être expliqué 1) par l'absence dans nos essais d'une autre espèce hôte de *Marteilia*, ou 2) par des paramètres expérimentaux non optimaux pour permettre cette transmission. Parmi, ces paramètres, il a pu être noté que la prévalence des copépodes impliqués dans ces essais ne dépassait pas 12%. Ces copépodes étaient échantillonnés en claire en 2000 et sur 9 prélèvements, seuls 3 comportaient des copépodes infectés par *M. refringens*. Ces faibles prévalences peuvent être considérées comme une limite dans nos essais de transmission expérimentale du parasite.

B. Objectif

Les prélèvements de copépodes en claire, révèlent des prévalences variables d'une année sur l'autre ce qui peut être considéré comme une limite à l'étude du cycle de *M. refringens*. Notre objectif est donc de bénéficier d'une population de copépodes fortement infectées de façon expérimentale, au laboratoire afin, 1) de renouveler les essais de transmission des copépodes vers les huîtres, 2) d'effectuer des études en microscopie électronique du parasite chez le copépode, 3) d'étudier le devenir du parasite après sa phase de développement chez le copépode.

II. Nouveaux essais de transmission

Expérimentalement, nous avons pu montrer la transmission du parasite de l'huître vers le copépode. Les prévalences observées chez les copépodes étaient néanmoins très faibles puisqu'elles ne dépassaient pas 3 % (cf 4^{ème} partie). Le protocole de transmission devait donc être amélioré pour obtenir des prévalences plus élevées chez le copépode. Les principales limites identifiées lors de ces premiers essais de transmission étaient ; 1) l'inoculum en parasite provenant des huîtres considéré comme trop faible et ponctuel, et 2) la disparition progressive des copépodes dans nos bacs. Pour surpasser ces deux limites, nous avons choisi de prélever les fèces d'huîtres parasitées libérant le parasite, pour les exposer directement aux copépodes élevés au laboratoire.

A. Obtention d'un élevage de copépodes *Paracartia grani*

1. Méthode

Paracartia grani est un copépode caractérisé par un cycle saisonnier. La présence de l'ensemble des stades de développement est notée du printemps jusqu'à l'automne alors qu'en hiver ce copépode est présent exclusivement sous forme d'œufs dits de durée, dont l'éclosion est déclenchée par les augmentations printanières de température. Notre stratégie pour réaliser l'élevage de *P. grani* a été basée sur cette particularité.

En février 2001, du sédiment de la claire ostréicole a été échantillonné. Au laboratoire, ce sédiment a été tamisé sur une maille de 200 µm, et la part inférieure à cette taille a été placée en bac avec de l'eau filtrée provenant du laboratoire (Figure 1). La température de la pièce où ces bacs étaient situés, était maintenue à 20°C afin d'obtenir une température de l'eau avoisinant les 18°C. Cette température est considérée comme la température minimale permettant l'éclosion des œufs de durée de *P. grani* (Rodriguez *et al.*, 1995). Au sein de chaque bac, un apport journalier d'un mélange d'algues *Isochrysis galbana* et *Chaetoceros calcitrans* était effectué et un apport d'eau filtrée était effectué tous les 3 jours.

2. Résultat

Au bout de 5 jours, les premiers nauplii de copépodes sont observés dans ces bacs. Dix jours après, des stades adultes de *P. grani* sont observés.

Au cours des 2 premiers mois de l'élevage, *Acartia discaudata* et *Acartia tonsa* ont pu être observés au sein des élevages, cependant, avec l'augmentation de la température de la salle (soumise à l'augmentation des températures extérieures) et un apport plus régulier et plus important en nourriture, il s'avère que l'espèce *P. grani* est devenue l'espèce la plus abondante. En effet, en milieu naturel, cette espèce est sensible aux manques de nourriture mais elle peut rapidement répondre aux augmentations de la quantité de nourriture en produisant un grand nombre d'œufs (Rodriguez *et al.*, 1995). Cette sensibilité face aux manques de nourriture explique cette espèce est observée dans les zones confinées où les variations concernant le phytoplancton sont de faibles amplitudes (Calbet et Alcaraz, 1997).



Figure 1 : Bacs d'élevage de copépodes *Paracartia grani*

B. Récolte des sporanges de *Marteilia refringens*

Des huîtres plates parasitées par *Marteilia refringens* avec une prévalence de 38%, sont maintenues à une température inférieure à 12°C afin de « bloquer » le cycle de développement du parasite et donc de limiter la libération de sporanges avant le début de l'essai de transmission (Figure 2).

Une partie de ces huîtres sont placées dans un bac où la température est supérieure à 12°C, ce qui permet de relancer le cycle de *Marteilia* et par conséquent la libération du parasite au sein des fèces.

Les fèces de ces huîtres sont alors prélevés et placés entre lame et lamelles. L'observation au microscope de ces fèces permet de contrôler la présence ou l'absence de sporanges au sein de ces fèces.

Dans le cas où les fèces contiennent des sporanges ces huîtres sont maintenues dans ce bac jusqu'à ce qu'elles ne libèrent plus de sporanges. Ces fèces contenant les sporanges de

Marteilia sont journallement prélevés et mis en présence de copépodes prélevés au sein des bacs d'élevage et placés au sein de différents bacs.

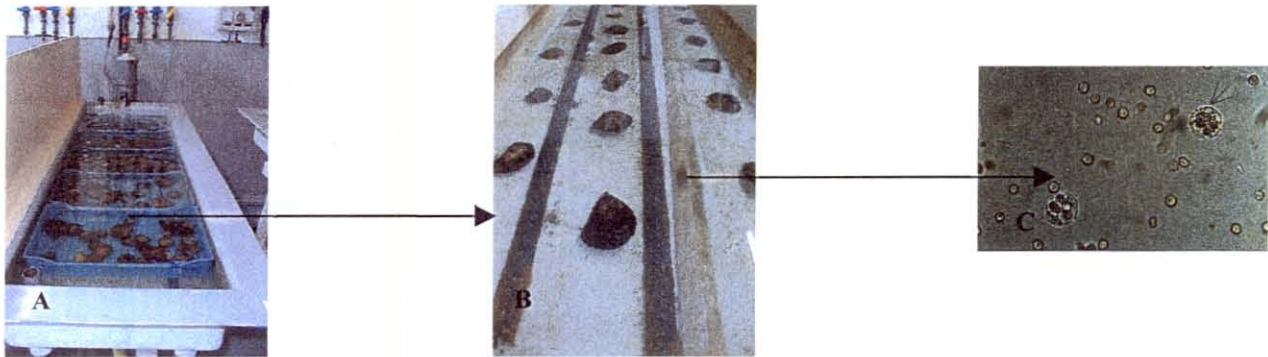


Figure 2 : Processus permettant de sélectionner les huîtres parasitées et les fèces contenant des sporanges : (A), Huîtres parasitées à 48 % maintenues à 11°C, (B), Huîtres à tester par analyse de leur fèces sous microscope, (C), analyse sur le frais de fèces et visualisation des sporanges de *Marteilia* sous microscope.

C. Essais de transmission

1. Méthode

Des copépodes *Paracartia grani* provenant de l'élevage étaient placés en bacs contenant de l'eau filtrée (Figure 3). Chaque jour un apport en fèces d'huîtres parasitées est effectué.

A j+7, un prélèvement de copépodes est effectué et la recherche du parasite est réalisée par hybridation *in situ*. D'après les précédents essais de transmission (cf publication dans *Parasitology*), 7 jours de mise en présence avec des sporanges suffisent à l'infection des copépodes.



Figure 3 : Bacs d'essai de transmission expérimentale du parasite de l'huître (forme libérée par l'huître ; le sporange) vers les copépodes.

2. Résultats

L'analyse par hybridation *in situ* de l'infection des copépodes *P. grani* exposés pendant 7 jours à des sporanges de *M. refringens* a mis en évidence un pourcentage important de copépodes parasités. En effet, sur 48 individus (mâles et femelles), 17 étaient parasités soit 35%. L'analyse par hybridation *in situ* des copépodes d'élevage a confirmé l'absence d'infection des copépodes dans ces bacs.

Ce résultat a permis d'une part, de confirmer les précédents résultats ayant démontré la transmission du parasite de l'huître vers le copépode, et, d'autre part, il permet d'obtenir une prévalence chez les copépodes très intéressante pour les travaux expérimentaux. Cette prévalence est nettement supérieure aux prévalences observées en claire ne dépassant pas les 25%.

L'obtention de telles prévalences est susceptible de nous permettre de réitérer les essais de transmission du parasite du copépode vers l'huître, de pouvoir effectuer une étude ultrastructurale du parasite au sein des copépodes par microscopie électronique à transmission et d'étudier le devenir du parasite après le copépode (pontes d'œufs parasités, formes libres du parasite, ...).

III. Appendice : les limites

Il faut noter que des essais supplémentaires de transmission du parasite vers les copépodes selon le protocole décrit ci-dessus, n'ont pas permis de renouveler ces fortes prévalences. Ces difficultés posent une limite à l'obtention de copépodes parasités au laboratoire. Ces faibles prévalences limitent les essais de transmission du parasite du copépode vers l'huître, mais aussi l'étude du parasite chez le copépode et l'étude de son devenir.

Plusieurs hypothèses ont été soulevées afin d'expliquer ces échecs de transmission du parasite vers les copépodes:

A. Salinité

La salinité des bacs contenant les huîtres libérant des sporanges s'élevait à 33. La salinité des bacs fonctionnant en système fermé et contenant les copépodes mis en présence de ces sporanges a peu à peu augmenté pour atteindre 40.

Cette différence de salinité, pourrait avoir fait subir un choc osmotique aux sporanges passant de 33 à 40. Face à cette observation, la salinité a été maintenue pour la suite des essais à moins de 35 dans l'ensemble des bacs. Néanmoins, malgré ce contrôle, à nouveau aucun copépode parasité n'a pu être observé.

B. Apport en sporanges

Le nombre d'huîtres libérant des sporanges n'a pu être maintenu à un niveau constant lors des essais supplémentaires de transmission du parasite aux copépodes sains. L'apport en sporanges était effectué de façon moins régulière que lors du premier essai de transmission ayant aboutit à 35% des copépodes parasités.

C. Vieillessement de la population de copépodes

Nous l'avons précédemment noté, des cas de parasitisme sont observables chez *P. grani* aux stades adultes mais aussi aux stades copépodites. Cependant, nous n'avons pu déterminer si

l'infection se produit lors de ces différents stades de développement ayant en commun la présence de gonade (en cours de formation ou formée), ou si l'infection n'aurait lieu qu'au stade copépodite.

Dans le cas où l'infection ne se produirait qu'aux stades copépodites, le vieillissement de la population de copépodes observé au sein des différents bacs de transmission et se traduisant par une proportion de plus en plus faible de copépodites, pourrait expliquer que les copépodes soient non infectés. Pour palier, à cette évolution, l'apport régulier en copépodites provenant de l'élevage devra être effectué dans de futurs essais de transmission.